ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 6 Fascicule 4 1985



LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
12 RUE DE BUFFON, 75005 PARIS

PUBLICATION TRIMESTRIELLE SUBVENTIONNÉE PAR LE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

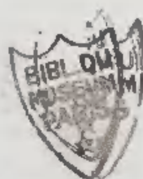
SOMMAIRE

CRYPTOGAMIE

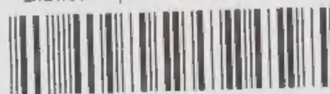
MYCOLOGIE

TOME 6 Fascicule 4 1985

Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM



DIRECTEUR DE LA PUBLICATION : Madame J. NICOT.
ADMINISTRATION : Mme LOCQUIN-LINARD M. et M. ZAMBETTAKIS Ch.
SECRÉTAIRE DE RÉDACTION : Mme M.C. BOISSELIER. ÉDITEUR : A.D.A.C.



CRYPTOGAMIE MYCOLOGIE

CONTENTS

(Tome 6, Fascicule 4, 1985)

ACTIVITÉ COLONISATRICE DES BASIDIOMYCETES SUR BOIS ENTERRÉS DANS TROIS SOLS VOLCANIQUES SOUS CONDITIONS DE LABORATOIRE

par Lina BETTUCCI*

RÉSUMÉ. — Analyse de l'aptitude colonisatrice de 3 souches de Basidiomycètes isolées d'éprouvettes de bois enfouies dans les sols de trois sites différents. Étude des effets de la communauté lignofile colonisatrice des sols sur ces souches.

Des morceaux de bois préincubés durant des périodes très différentes, en sol réhumectés et en sols frais, ont été incubés en même temps que du bois inoculé par une souche de Basidiomycète. Le même traitement a été effectué avec des sols stériles.

Les sols frais ou secs-réhumectés n'influent pas de façon différente sur la faculté de colonisation par les souches de Basidiomycètes bien que la dessication et la réhumidification réduisent la mycoflore du sol.

La mycoflore colonisatrice des éprouvettes préincubées dans les trois sols frais est différente de celle des éprouvettes des sols secs-réhumectés. Dans tous les cas, la mycoflore lignophile limite l'aptitude colonisatrice des Basidiomycètes.

La faculté de colonisation par les Basidiomycètes étudiés ne dépend pas de la durée de la préincubation dans le sol. Ces résultats contredisent le schéma de Garrett qui suppose que les Basidiomycètes sont des colonisateurs tardifs, se développant après les champignons à équipement enzymatique plus réduit.

SUMMARY. — In this study I analyze the colonizing capacity of Basidiomycetes strains isolated from stakes buried in soils of three different sites, and the effect of the colonizing fungal lignofilic community on these strains.

Woods of small dimensions, preincubated during very different periods in dry rehumidified soils and in fresh soils, were incubated with woods inoculated with a strain of Basidiomycetes. The same treatment was carried on using sterile soils.

The dry rehumidified soils and the fresh ones do not affect in a different way the colonizing capacity of the Basidiomycetes strain used; although the drying and rehumidification does reduce and modify the soil microflora.

On the other hand, the lignofilic microflora which colonizes woods preincubated in dry rehumidified soils is different from that which was preincubated in the corresponding fresh soils. In all the cases, the lignofilic microflora limits the colonizing capacity of the Basidiomycetes.

The results reflect, furthermore, that the colonizing capacity of the Basidiomycetes strains does not depend of the wood preincubation time in the soil. They also do not

* Rambla M. Gandhi 373, Montevideo, Uruguay.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptogamie, Mycol.)*, TOME 6 (1985).

confirm Garrett's schema, which presupposes that the Basidiomycetes are late colonizers, that is, that they colonize only after the colonization by a microflora which uses components that require a more reduced enzymatic system.

RESUMEN. – En este estudio se analizó la capacidad de colonización de cepas de Basidiomycetes, aislados de estacas enterradas, en suelos de tres sitios y el efecto de la comunidad fúngica lignofílica colonizadora sobre estas cepas.

Maderas de pequeñas dimensiones preincubadas durante periodos muy diferentes en suelos secos rehumectados y en suelos frescos, se incubaron con maderas inoculadas con una cepa de Basidiomycete. El mismo tratamiento se realizó utilizando suelos esteriles.

Los suelos secos rehumectados o frescos no influyen de manera diferente sobre la capacidad de colonización de las cepas de Basidiomycetes ensayados, si bien la desecación y rehumectación reducen y modifican la micoflora del suelo.

Por otra parte, la microflora lignofílica colonizadora de las maderas preincubadas en los suelos secos rehumectados es diferente de aquéllas preincubadas en los correspondientes suelos frescos. En todos los casos la micoflora lignofílica limita la capacidad colonizadora de los Basidiomycetes.

Los resultados reflejarían, ademas, que la capacidad de colonización de las cepas de Basidiomycetes no depende del tiempo de incubación en el suelo. Tampoco confirman el esquema de Garrett, que supone que los Basidiomycetes son colonizadores tardíos, o sea, que colonizan luego que lo hace la micoflora que utiliza componentes que requieren un sistema enzimático más reducido.

MOTS CLÉS : bois enterré, Basidiomycètes, sol volcanique, pourriture blanche, pourriture brune, champignons lignophiles.

INTRODUCTION

Les Basidiomycètes jouent un rôle clef dans la décomposition des bois et des litières; il nous a paru important de savoir s'ils étaient capables de coloniser des bois incubés dans le sol.

Dans cette étude nous avons donc analysé l'aptitude à la colonisation de trois souches de Basidiomycètes isolées d'éprouvettes d'*Abies religiosa* enterrées pendant un an dans le Parc National Desierto de Los Leones, au Mexique (BETTUCCI, 1983).

L'incubation des échantillons de bois à coloniser a été effectuée dans des prélèvements de l'horizon A_0 des trois sites, La Joya, Nexpayantla et La Tijera, situés sur la pente occidentale du volcan Popocatepetl, respectivement à 3660 m, 3300 m et 2980 m au-dessus du niveau de la mer.

Nous avons essayé de déterminer si les sols, provenant des différents sites, modifient d'une façon significative la capacité de colonisation des souches de Basidiomycètes.

Dans le même temps, on a voulu savoir si la résistance éventuelle de ces sols à la propagation des Basidiomycètes était due à leurs propriétés physiques et chimiques ou bien à des facteurs biotiques antagonistes.

Nous avons également cherché à distinguer, autant que possible, les effets des facteurs biotiques , et ceux des facteurs physiques et chimiques, en désin-

fectant ou non les sols. On a introduit simultanément des éprouvettes précolonisées par un des Basidiomycètes étudiés, soit une éprouvette fraîche, soit une éprouvette préincubée pendant deux ans et demi dans les sols des trois sites.

L'horizon superficiel a été choisi car c'est celui-ci où l'on trouve la plus forte activité de décomposition des principaux composants structuraux du bois : lignite et cellulose (KONONOVA, 1966; DOMMERGUES & MANGENOT, 1970; MANGENOT & REISINGER, 1972; DUCHAUFOUR, 1980; SWIFT & al., 1979).

De plus il y a peu de renseignements publiés (entre autres, MARTINEZ & RAMIREZ, 1979; PEÑA-CABRIALES & VALDES, 1975) sur les caractéristiques biologiques des sols évolués à partir des matériaux pyroclastiques alors que leur composition minéralogique est très particulière (HETIER, 1975; DUCHAUFOUR & SOUCHIER, 1977, 1979).

En fin d'incubation les populations de toutes les éprouvettes seront analysées. Ceci nous renseignera sur l'aptitude de l'inoculum de Basidiomycète à coloniser le bois en présence de sol, que ce bois soit vierge ou déjà colonisé, et sur la colonisation, à partir du sol, d'éprouvettes précolonisées par un Basidiomycète.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Des échantillons de bois d'*Abies religiosa* de 0,5 x 1,5 x 3,5 cm, ont été incubés dans les prélèvements de sols, horizon A_0, provenant des sites La Joya, Nexpayantla et La Tijera.

Deux séries ont été réalisées. Dans la première on a utilisé des prélèvements de sol frais effectués selon la technique décrite par BETTUCCI (1983). Dans la seconde, les sols ont été préalablement séchés à l'air.

1ère SÉRIE : SOLS FRAIS

Préincubation des échantillons de bois en sol désinfecté : Les échantillons de sol ont été prélevés dans les sites de La Joya, Nexpayantla et La Tijera 24 heures avant le début du traitement. Ils ont été conservés à + 5°C, puis tamisés et portés à quasi saturation d'eau. (On a ajouté 10 % d'eau distillée stérile à l'échantillon de La Joya, 12,5 % à celui de Nexpayantla et 10 % à celui de La Tijera).

Avec une certaine quantité de sol de chaque site, on a rempli 9 boîtes de Petri en plastique. Dans chaque boîte on a placé 2 échantillons de bois et on a désinfecté le tout par irradiation β à 2,5 Mrad. La préincubation s'est alors poursuivie pendant 6 semaines.

Préincubation des échantillons de bois en sol non désinfecté : On a utilisé des bois préincubés, pendant deux ans et demi dans des prélèvements de sols provenant des trois sites et non utilisés pour l'étude des communautés fongiques colonisatrices du bois d'*Abies religiosa* (BETTUCCI, 1984). Avant l'emploi,

leurs dimensions sont ramenées à celles d'autres éprouvettes, soit 0,5 x 1,5 x 3,5 cm.

Préparation des inoculums : Les souches de Basidiomycètes portant les références 95, 103, et 96 ont été inoculées séparément en milieu de culture malt-gélosé, en fioles de Roux de 1 litre. Après 10 jours environ, lorsque les colonies couvraient entièrement la surface du milieu de culture, on a introduit 10 échantillons de bois stériles dans chaque fiole, soit 60 pour chaque souche. L'incubation a duré 6 semaines. Des éprouvettes-inoculums choisies au hasard ont été analysées comme on le verra plus loin, pour connaître le taux de colonisation du bois au moment de l'inoculation.

Incubation : Pour les 2 traitements, une éprouvette colonisée par une souche de Basidiomycète est introduite dans chaque boîte de Petri entre les deux éprouvettes préincubées, en sol désinfecté ou en sol normal.

Les témoins sont constitués par des boîtes de Petri remplies de sol et contenant 3 éprouvettes préincubées en sol désinfecté ou non.

2ème SÉRIE : SOLS SECS-RÉHUMECTÉS

On a utilisé ici des sols provenant des sites de La Joya, Nexpayantla et La Tijera, conservés secs à l'air pendant environ 3 mois. Au moment de l'emploi, ils ont été réhumectés avec de l'eau distillée stérile jusqu'à quasi saturation.

Aux prélèvements du sol de La Joya on a ajouté 35 % d'eau, 45 % à celui de Nexpayantla et 35 % à celui de La Tijera.

Préincubation en sol désinfecté : Elle a lieu comme dans le cas des sols frais.

Préincubation en sol non désinfecté : Une partie des sols a été distribuée dans des bocaux de verre stériles de 500 ml, munis d'un couvercle perforé en son centre et bouché avec du coton. On a introduit dans chaque bocal 6 échantillons de bois stériles. La préincubation s'est poursuivie pendant 6 semaines.

L'inoculum est préparé comme précédemment.

Incubation : Dans le cas des sols désinfectés elle a lieu dans les mêmes conditions que lors de la première série.

Dans le cas contraire les échantillons préincubés en sol non-désinfecté pendant 6 semaines ont été replacés dans des boîtes de Petri contenant du sol sec-réhumecté et l'inoculation a lieu par la méthode habituelle. Les témoins sont obtenus comme lors de la première série.

On dispose de trois répétitions pour chaque traitement et chaque témoin, c'est-à-dire de 6 éprouvettes préincubées et 3 éprouvettes-inoculums pour les traitements et 9 éprouvettes pour les témoins. La préincubation et l'incubation sont faites à l'humidité constante du sol et à + 19°C de température.

Les analyses ont lieu après 6 semaines d'incubation.

ANALYSES DES PRÉLEVEMENTS

Elles ont porté sur des éprouvettes-inoculums comme on l'a vu plus haut et sur la totalité des éprouvettes après incubation. Dans tous les cas on a pris 20 éclats de bois qui ont été transférés sur un milieu de culture sélectif pour Basidiomycètes (TAYLOR, 1971) : glucose 10 g, KH_2PO_4 1g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, $MgSO_4$ 0,5g, peptone 1,5g, gélose 15g, eau distillée 1000 ml, agents sélectifs : benomyl 5 μg/l, néomycine 50 μg/l et streptomycine 50 μg/l.

L'activité colonisatrice des souches de Basidiomycètes a été représentée par le pourcentage d'éclats de bois donnant naissance, sur milieu de Taylor, à une colonie caractéristique de la souche étudiée.

Les souches de Basidiomycètes 95 et 103 appartiennent au même groupe, or, ici, elles ont été étudiées séparément. En effet, la coushe 103 présente des caractères culturaux un peu différents mais qui correspondent encore au groupe. Les deux cultures ont une réaction positive aux tests des oxydases extracellulaires (DAVIDSON & al., 1938; NOBLES, 1958). La troisième souche de Basidiomycète utilisée, la souche 96, a, par contre, une réaction négative aux tests des oxydases extracellulaires.

RÉSULTATS

COLONISATION DES ÉPROUVETTES PAR LES BASIDIOMYCETES

Cas des éprouvettes - inoculums : 95% à 100% des éclats de bois préincubés dans les cultures des souches 95, 103 et 96 de Basidiomycètes étaient colonisés par les souches correspondantes. Dans tous les cas, après l'incubation, les pourcentages de récupération de ces souches se sont particulièrement réduits (Tab. 1).

Tableau 1. — Récupération de souches de Basidiomycètes (en pourcentages)

Table 1. — Rate of Basidiomycetes strains reisolated (%)

Préincubation	Incubation en sol frais			Incubation en sol sec-réhumidifié		
souche	La Joya	Nexpa.	La Tijera	La Joya	Nexpa.	La Tijera
95	36,7	1,7	0	13,3	0	0
103	31,7	15	0	50	21,6	13,3
96	30	80	53,3	65	28,3	58,3

Colonisation des éprouvettes préincubées en sol désinfecté : Les éprouvettes ont été colonisées à plus de 95 % par les souches de Basidiomycètes 95, 103 et 96 (Tab. 2 et 3). Il n'y a pas de différences significatives avec les pourcentages de colonisation des éclats de bois provenant des éprouvettes-inoculums correspondantes. Cependant les souches 95 et 103 produisent une pourriture blanche et la souche 96 produit une pourriture brune sur toutes les éprouvettes colonisées. .

Colonisation des éprouvettes préincubées en sol non désinfecté : Les éclats de bois n'ont fourni aucune colonie des souches 95 et 103 quel que soit le site et la série. Par contre ils ont été colonisés par la souche 96 dans des pourcentages variables selon la provenance du sol.

Tableau 2. — Fréquence d'isolements des souches 95, 103 et 96 de Basidiomycètes. Sol désinfecté, frais.

Table 2. — Isolation frequencies of 95, 103 and 96 Basidiomycetes strains. Desinfected fresh soil.

Incubés	La Joya				Nexpayantla				La Tijera			
avec 95	1*	2	3		1	2	3		1	2	3	
Bois 1	20	20	18		20	20	20		20	20	20	
Bois 2	20	20	20		20	20	19		20	20	19	
Total	40	40	38	118	40	40	39	119	40	40	39	119
%				98,3%				99,1%				99,1%
Incubés avec 103												
Bois 1	19	19	20		18	19	20		20	20	20	
Bois 2	20	19	20		19	20	20		20	19	19	
Total	39	38	40	117	37	39	40	116	40	39	39	118
%				97,5%				96,6%				98,3%
Incubés avec 96												
Bois 1	20	15	19		19	20	20		20	20	20	
Bois 2	20	20	20		20	20	20		20	19	20	
Total	40	35	39	114	39	40	40	119	40	39	40	119
%				95%				99,1%				99,1%

* 1, 2, 3 dans chaque site indiquent des répétitions.

Tableau 3. — Fréquence d'isolements des souches 95, 103 et 96 de Basidiomycètes. Sol désinfecté, sec-réhumecté.

Table 3. — Isolation frequencies of 95, 103 and 96 Basidiomycetes strains. Desinfected dry rehumidified soil.

Incubés	*La Joya*				*Nexpayantla*				*La Tijera*			
avec 95	1*	2	3		1	2	3		1	2	3	
Bois 1	19	20	20		19	20	20		20	20	20	
Bois 2	20	19	20		19	19	20		20	19	19	
Total	39	39	40	118	38	39	40	117	40	39	39	118
%				98,3%				97,5 %				98,3 %
Incubés avec 103												
Bois 1	20	20	20		20	19	19		20	19	20	
Bois 2	20	20	19		20	18	20		18	19	18	
Total	40	40	39	119	40	37	39	116	38	37	39	115
%				99,1 %				96,6 %				95,8 %
Incubés avec 96												
Bois 1	20	19	20		20	20	18		20	20	20	
Bois 2	20	20	18		20	20	19		20	17	20	
Total	40	39	38	117	40	40	37	117	40	37	40	117
%				97,5%				97,5 %				97,5 %

* 1, 2, 3 dans chaque site indiquent des répétitions.

Dans la première série (sols frais) les éclats de bois ont été colonisés à 25 % comme le cas du sol de La Joya, à 80,8% dans le cas de celui de Nexpayantla et à 37,5 % dans celui de la Tijera (Tab. 4).

COLONISATION DES ÉPROUVETTES PAR LES AUTRES CHAMPIGNONS

1ère série : éprouvettes préincubées en sols frais : Les éprouvettes préincubées en différents sols frais, pendant deux ans et demi et ensuite incubées avec les inoculums de souches de Basidiomycètes, contiennent d'autres champignons du

Tableau 4. – Pourcentages d'isolements de tous les échantillons de bois incubés. Sol non désinfecté, frais.

Table 4. – Isolation percents of all incubated wood samples. Non-desinfected fresh soil.

	L.J. 95	E.I. 95	L.J. 103	E.I. 103	L.J. 96	E.I. 96	T	Nex. 95	E.I. 95	Nex. 103	E.I. 103	Nex. 96	E.I. 96	T	L.T. 95	E.I. 95	L.T. 103	E.I. 103	L.T. 96	E.I. 96	T
Bactéries									5		3,3										
Acremonium butyri (van Beyma) Gams	10,8		3,3		16,7	3,3															
Cylindrocarpon heteronemum Berk. et Br.	2,5		0,8					58,3		40,8		13,3		16,7	1,7	1,7	6,7	3,3	1,7		2,5
Eupenicillium lasseni Paden								37,5	25	25	26,7	8,3	51,7	35,8		1,7		5			
Fusarium sp.	10		8,3							0,8						6,6	3,3			3,3	1,6
Humicola fuscoatra Traaen								0,8		11,7		5			10,8	3,3		1,7	1,7	8,3	
Penicillium janthinellum B. (souche 139)			5		10	8,3	25								5				0,8	3,3	2,5
Phialophora fastigiata (Lagerb. et Melin) Conant	38,3	10	9,2	6,7		5	15													10	1,3
Phialophora richardsiae (Nannf.) Conant	14,2		25,8		8,3					3,3											
Talaromyces flavus (Klöcker) Stolk et Samson									6,3		5	12,5	3,3	30,8							
Trichoderma pseudokoningii Rifai															10	30	13,3	43,3	42,5	11,7	33,3
Trichoderma viride Pers. ex Gray								0,8							36,7	20	25	23,3		5	24,3
Basidiomycète		36,7		31,7	25	30			1,7		15,0	80,8	80						37,5	53,3	
Mycélium hyalin stérile	6,7		17,5					1,7	6,7	4,2		2,5	3,3				15,8	2,5			
spp.			0,8		6,7			5,8		2,5							3,3	0,8	1,7		
Cladosporium herbarum (Pers.) Link				3,3			8,3		1,7		1,7			10							
Pestalotiopsis guepini (Desm.) Steyaert									6,7		3,3			5,8							

Abréviations : L.J. : La Joya; Nex. : Nexpayantla; L.T. : La Tijera; E.I. : éprouvettes-inoculums des Basidiomycètes; T : témoins.

sol qui avaient déjà été isolés (BETTUCCI, 1983).

Certaines espèces sont particulières à chaque sol. D'autres se rencontrent dans les éprouvettes préincubées en deux sols et seul le mycélium hyalin stérile (souche 508) a été commun aux trois sols mais avec des fréquences différentes (Tab. 4). Dans tous les cas les espèces ont été isolées avec des pourcentages qui dépendent de la souche de Basidiomycètes avec laquelle elles ont été incubées.

Ainsi *Phialophora fastigiata*, *Phialophora richardsiae*, *Fusarium* sp. (souche 518) et *Acremonium butyri* sont les principaux colonisateurs des éprouvettes préincubées en sol de La Joya; *Eupenicillium lasseni*, *Cylindrocarpon heteronemum* (par la haute fréquence) et *Talaromyces flavus* sont ceux des éprouvettes préincubées en sol Nexpayantla et *Trichoderma pseudokoningii* et *Trichoderma viride* des éprouvettes préincubées en sol de La Tijera.

Humicola fuscoatra a été l'espèce commune aux éprouvettes préincubées dans les sols de Nexpayantla et La Tijera et *Penicillium janthinellum* (souche 139), l'espèce commune à celles préincubées dans les sols de La Joya et La Tijera bien qu'avec des fréquences très différentes.

Les éprouvettes témoins, incubées dans le sol provenant de La Joya, ont été colonisées par *Penicillium janthinellum* (souche 139), *Phialophora fastigiata* et *Cladosporium herbarum*. Celles incubées dans le sol provenant de Nexpayantla, par *Cylindrocarpon heteronemum*, *Eupenicillium lasseni*, *Talaromyces flavus*, *Cladosporium herbarum* et *Pestalotiopsis guepini* et enfin celles incubées dans le sol, provenant de La Tijera par *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma viride*, *Cylindrocarpon heteronemum*, *Phialophora fastigiata*, *Penicillium janthinellum* et *Fusarium* sp. (souche 518). Ces espèces ont été isolées des éprouvettes incubées pendant un an dans les sols en question (BETTUCCI, 1983). Elles n'ont pas été colonisées par des Basidiomycètes (Tab. 4).

A partir des éprouvettes-inoculums, après incubation dans les trois sols, on a isolé, en plus des Basidiomycètes (cf. supra, Tab. 1) la plupart des espèces précédentes. *Phialophora fastigiata*, *Penicillium janthinellum*, et plus rarement *Acremonium butyri* et *Cladosporium herbarum* ont été rencontrés dans les bois incubés dans le sol de La Joya. De rares Bactéries, *Eupenicillium lasseni*, *Talaromyces flavus*, mycélium hyalin stérile (souche 508), *Cladosporium herbarum* et *Pestalotiopsis guepini* des bois incubés dans le sol de Nexpayantla et, finalement, *Cylindrocarpon heteronemum*, *Humicola fuscoatra*, *Penicillium janthinellum*, *Eupenicillium lasseni*, *Fusarium* sp., *Phialophora fastigiata*, mycélium hyalin stérile (souche 508) et les plus fréquemment isolés *Trichoderma pseudokoningii* ainsi que *Trichoderma viride* des bois incubés dans le sol de La Tijera (Tab. 4).

2ème série : éprouvettes préincubées en sols secs réhumectés : Les résultats figurant dans le tableau 5 montrent que la dessication à l'air a éliminé, dans les mêmes sols, la majeure partie de la mycoflore qui ne comprend plus que *Mucor mucedo*, *Trichoderma viride* et le mycélium hyalin stérile (souche 508) dans des fréquences variables. Les Bactéries, par contre, sont presque constantes.

Tableau 5. – Pourcentages d'isolements de tous les échantillons de bois incubés. Sol non désinfecté, sec-réhumecté.

Table 5. – Isolation percents of all incubated wood samples. Non-desinfected dry rehumidified soil.

	L.J.	E.I.	L.J.	E.I.	L.J.	E.I.	T	Nex.	E.I.	Nex.	E.I.	Nex.	E.I.	T	L.T.	E.I.	L.T.	E.I.	L.T.	E.I.	T
	95	95	103	103	96	96		95	95	103	103	96	96		95	95	103	103	96	96	
Bactéries	25	100	95	100	23,3	81,7	45		100	45,8	93,3		86.7	25,8	5	100	28,3	74,2		100	31,7
Mucor mucedo Mich. ex St.			7,5					21,7		6.7	1.7	21,7		8,3	0,8				1,7		6,7
Trichoderma viride Pers. ex Gray								20	6,7	23,3	18.3	3,3		13,3	12,5	18,3	14,7	33,3	22,5	3,3	15,8
Mycélium hyalin stérile souche 508	52,5		4,2	5	33,3		9,2	99,2		48,3	3,3	95	1,7	67.5	59.2	10	28,3	20	86,7		61,6
Basidiomycètes		13,3		50	46,7	65					21.6	25.8	28,3					13,3	23,3	58.3	
spp.	20	11,7		6,6			6,7	1.7	8,3		20		1,7	1,7	3,3		2,5		11,7	1,7	

Abréviations : L.J. : La Joya; Nex. : Nexpayantla; L.T. : La Tijera; E.I. : éprouvettes-inoculums des Basidiomycètes; T : témoins.

Cependant comme dans la première série seule la souche 96 des Basidiomycètes a pu coloniser les éprouvettes préincubées dans tous les sols.

Les éprouvettes témoins ont été aussi colonisées par des bactéries, *Mucor mucedo*, *Trichoderma viride* et mycélium hyalin stérile (souche 508). Elles n'ont pas été colonisées par des Basidiomycètes (Tab. 5).

En ce qui concerne les éprouvettes-inoculums, elles sont largement colonisées par des Bactéries. *Trichoderma viride* est presque constamment présent à Nexpayantla et La Tijera. Les autres espèces, *Mucor mucedo* et mycélium hyalin stérile (souche 508), sont peu souvent isolées mais à partir des 3 sols (Tab. 5).

DISCUSSION

Il n'y a pas de différence significative entre les pourcentages des champignons isolés d'éclats de bois préincubés en sol désinfecté et colonisé par les Basidiomycètes et les pourcentages de récupération des mêmes souches à partir des éprouvettes-inoculums. On n'a pas, non plus, observé de différence significative avec le pourcentage des souches provenant des éclats de bois colonisés avant incubation dans le sol désinfecté. Il semble que les caractéristiques physico-chimiques du sol n'influent pas sur la capacité de colonisation des souches de Basidiomycètes 95, 103 et 96.

Les souches de Basidiomycètes 95 et 103 n'ont pas colonisé les éprouvettes préincubées dans les sols frais ou dans les sols secs-réhumectés non désinfectés des trois sites.

En ce qui concerne leur conservation dans les éprouvettes-inoculums incubées dans les sols frais, elle est variable. Les deux souches n'ont pas été isolées dans le cas de sol de La Tijera. Peu d'éclats les renferment dans celui de Nexpayantla bien que la souche 103 semble mieux se conserver que la souche 95, alors qu'elle est encore présente dans plus de 30 % des éclats à La Joya.

Dans le cas des sols secs-réhumectés les résultats concordent avec les précédents : conservation des deux souches après incubation dans le sol de La Joya et conservation de la souche 103 seule dans les deux autres sols.

Par contre, la souche 96 a été isolée non seulement des éprouvettes-inoculums incubées dans les trois sols, frais ou secs-réhumectés mais aussi des bois préincubés dans ces sols.

Ceci semble refléter une grande aptitude à la compétition de la souche 96 par rapport aux souches 95 et 103, au moins dans les conditions expérimentales.

Les éprouvettes incubées dans les sols de La Joya pendant deux ans et demi ont été colonisées d'une manière dominante par *Phialophora* spp., ce qui n'était pas apparu au même degré après un an d'incubation, et par *Acremonium butyri* qui n'avait pas été isolé à la même époque (BETTUCCI, 1983). BANERJEE & LEVY (1971) soutiennent qu'il existe une association positive entre *Phialophora* spp. et les Basidiomycètes. Ceci n'a pas été observé dans nos expériences, du

moins dans le cas des souches de Basidiomycètes 95 et 103.

Cylindrocarpon heteronemum et *Eupenicillium lasseni*, ont été les espèces dominantes dans les bois incubés dans le sol de Nexpayantla, ce qui n'était pas apparu non plus, après un an d'incubation. Il a été observé un certain degré d'antagonisme, *in vitro*, entre *Cylindrocarpon* sp. et l'unique isolement (dans ce sol) de *Trichoderma viride*. DOMSCH & al. (1980) signalent une activité antagoniste de certaines espèces de *Cylindrocarpon* vis-à-vis d'autres espèces de champignons.

Dans le sol de La Tijera, les bois incubés en présence d'inoculums des souches 95 et 103 ont été colonisés à 30 % environ par *T. viride*. Celui-ci est absent des éprouvettes incubées en présence d'inoculum de la souche 96. *Trichoderma pseudokoningii* a été aussi isolé des éprouvettes incubées dans le sol de La Tijera, inoculées par les trois souches de Basidiomycètes; toutefois la fréquence d'isolement est plus élevée en présence de l'inoculum 96, donc quand *T. viride* fait défaut.

HULME & SHIELDS (1975), RICARD (1977), DOMSCH & al. (1980), parmi beaucoup d'autres, citent l'activité anti-Hyménomycètes, bien connue que possède le groupe de *T. viride* ainsi que d'autres espèces de *Trichoderma*. Elle est même mise à profit pour la lutte biologique contre les Basidiomycètes lignivores. Comme on l'a vu déjà (BETTUCCI, 1983; BETTUCCI & RODRIGUEZ, 1975), chaque fois que l'on a isolé des souches de Basidiomycètes, *T. viride* a été rencontré.

Les éprouvettes incubées dans les sols secs-réhumectés ont une mycoflore extrêmement réduite et modifiée probablement par suite de la dessication et de la contamination.

Le mycélium hyalin stérile (souche 508) a été isolé de presque tous les échantillons. *Trichoderma viride* a été isolé des éprouvettes incubées dans les sols de La Tijera et de Nexpayantla. Pourtant il n'avait jamais été mis en évidence dans ce dernier site, par incubation des éprouvettes *in vitro* en sol frais pendant un an. Il n'a pas été isolé non plus par dilution de sol sur malt-gélosé 2 % des sols frais prélevés pendant la période sèche utilisés dans la même expérience, mais l'a été des sols secs-réhumectés prélevés pendant la saison des pluies, utilisés dans cette expérience (BETTUCCI, 1983, données non publiées). Mais il est toujours absent des éprouvettes incubées dans le Ranker de La Joya. Le troisième champignon est *Mucor mucedo* absent de toutes les analyses antérieures.

On a remarqué aussi que la souche de Basidiomycète 96 était souvent obtenue à partir du même éclat que le mycélium hyalin stérile (souche 508) qu'il dépassait après deux semaines d'incubation.

Le résultat le plus surprenant a été l'abondance des Bactéries. Dans les boîtes inoculées par les éclats des éprouvettes-inoculums du Basidiomycète 103, 95 % des éclats en produisaient, bien que l'isolement ait été fait sur milieu de Taylor contenant des antibiotiques.

L'effet inhibiteur des Bactéries sur les champignons des bois a déjà été étudié (LAPETITE, 1970; GREAVES, 1970; MOORE-LANDECKER & STOT-

SKY, 1972) ainsi que leur effet synergique (SMITH, 1975). Dans nos expériences aucun de ces deux effets n'a été démontré en particulier sur la souche 96. Enfin les Bactéries sont très rares ou absentes de deux sols forestiers.

On peut se demander : a) pourquoi dans les éprouvettes-inoculums les souches de Basidiomycètes sont réisolées en nombre réduit après l'incubation, tant en sols frais qu'en sols sec-réhumectés et b) pourquoi les éprouvettes pré-incubées dans des sols frais ou sec-réhumectés n'ont pas été colonisées par les souches 95 et 103 et l'ont été par la souche 96.

HULME & SHIELDS (1972) ont observé que dans des éprouvettes inoculées avec *Polyporus versicolor* ou avec *Polyporus adustus* et inoculées à nouveau après 15 jours avec un champignon non lignivore, la pourriture n'était pas empêchée si l'éprouvette de bois était placée sur le sol. Par contre si elle était enfouie, alors, les résultats étaient différents : la pourriture par *P. versicolor* était très réduite et beaucoup moins par *P. adustus*, probablement, selon HULME & SHIELDS, à cause de l'humidité élevée, d'une possible anaerobiose partielle et la présence de substances nutritives solubles dans le sol qui ont agi favorablement sur les champignons non lignivores. Or si le premier colonisateur était un champignon non lignivore, la pourriture était fortement restreinte ou nulle, même sur le sol.

Nos résultats et les résultats signalés plus haut, suggèrent qu'il y a des différences entre les souches de Basidiomycètes face aux effets inhibiteurs de la microflore du sol, et que les Basidiomycètes se développent s'ils colonisent de façon précoce.

Étant donné que les souches 95 et 103 ont été isolées des bois enterrés *in situ*, dans un sol semblable à ceux des trois sites, et à la 5ème semaine, il semble probable que leur incapacité de colonisation est due à plusieurs facteurs. L'un d'eux est la faible capacité compétitive, mais les conditions expérimentales jouent aussi un rôle important ainsi que l'évolution des communautés dans les conditions de l'environnement, par exemple : l'évolution de l'humidité du sol et en conséquence du bois *in situ*. En plus, l'humidité proche de la saturation est très défavorable aux pourritures blanches (MANGENOT, communication personnelle).

CONCLUSIONS

– Les souches de Basidiomycètes 95, 103 et 96 possèdent la même capacité de colonisation en sols frais ou secs-réhumectés, de différents sites, tous dérivés de cendres volcaniques, pourvu qu'ils soient désinfectés.

– Les sols frais ou secs-réhumectés, non désinfectés, n'influent pas de façon différente, sur la capacité de colonisation des souches de basidiomycètes 95, 103 et 96, bien que la dessication et la réhumectation réduisent et modifient la mycoflore du sol.

— La souche de Basidiomycètes 96 possède une plus grande capacité de colonisation et de réisolement en milieu de culture, que les souches 95 et 103 des éprouvettes incubées en sols frais ou secs-réhumectés, non désinfectés, des trois sites.

— La mycoflore colonisatrice des éprouvettes préincubées dans les trois sols frais est très différente de celles préincubées dans les sols sec-réhumectés sauf pour le mycélium hyalin stérile (souche 508).

— Les espèces de *Trichoderma* n'existent que dans les éprouvettes préincubées dans les deux Andosols et jamais, même après séchage et réhumectation, dans celles préincubées dans le Ranker.

— La colonisation des éprouvettes par la souche 96 de Basidiomycètes n'est pas empêchée par *Trichoderma viride* dans tous les cas où ces deux champignons coexistent, c'est-à-dire, les sols frais ou sec-réhumecté de La Tijera et sec-réhumecté de Nexpayantla.

— On a observé une association fréquence de la souche 96 de Basidiomycètes et du mycélium hyalin stérile (souche 508).

— La flore mycologique du sol qui colonise les bois-inoculums, c'est-à-dire ceux préincubés dans les cultures des souches de Basidiomycètes, réduit le pourcentage de réisolement des dites souches dans le milieu de culture.

— La colonisation des bois par les souches de Basidiomycètes 95, 103 et 96, n'a pas été favorisée par une période de préincubation relativement prolongée (deux ans et demi), dans les conditions de l'expérience, comme on pourrait s'y attendre selon le schéma de colonisation proposé par GARRETT.

BIBLIOGRAPHIE

BANERJEE A.K. and LEVY J.F., 1971 — Fungal succession in wooden fence posts. *Material und Organismen* 6 : 1-25.

BETTUCCI L. y RODRIGUEZ D., 1975 — Sucesiones de microorganismos que colonizan y deterioran maderas enterradas. Memorias del VI Congreso Mexicano de Botanica. Abstract : 111.

BETTUCCI L., 1983 — Colonisation de bois d'*Abies religiosa*. Thèse Doct. État, Université de Nancy, 182 p.

BETTUCCI L., 1984 — Étude de la colonisation fongique d'éprouvettes de bois d'*Abies religiosa*. *Cryptogamie, Mycol.* 5 : 247-268.

DAVIDSON R.W., CAMPBELL W.A. and BLAISDELL D.J., 1938 — Differentiation of of wood decaying fungi by their reactions on gallic or tanic acid medium. *J. Agric. Res.* 57 : 683-695.

DOMMERGUES Y. et MANGENOT F., 1970 — Écologie microbienne du sol. Paris, Masson, 796 p.

DOMSCH K.H., GAMS W. and ANDERSON T., 1980 — Compendium of soil fungi. Lon-

don, Academic Press, 2 vol. : 859 p., 405 p.

DUCHAUFOUR P. et SOUCHIER B., 1977, 1979 – Pédologie. Paris, Masson, 2 vol. : 477 p.; 459 p.

DUCHAUFOUR P., 1980 – Écologie de l'humification et pédogénèse des sols forestiers. *In* : P. PESSON, *Actualités d'écologie forestière: sol, flore, faune.* Paris, Gauthier-Villars : 177-201.

GREAVES H., 1970 – The effect of selected bacteria and Actinomycetes on the decay capacity of some wood-rotting fungi. *Material und Organismen* 5 : 265-279.

HETIER J.M., 1975 – Formation et évolution des andosols en climat tempéré. Thèse Université de Nancy I.

HULME M.A. and SHIELDS K.J., 1972 – Interaction between fungi in wood blocks. *Canad. J. Bot.* 50 : 1421-1427.

HULME M.A. and SHIELDS K.J., 1975 – Antagonistic and synergistic effects for biological control of decay. *In* : W. LIESE, *Biological transformation of wood by microorganisms.* 52-63.

KONONOVA M.M., 1966 – Soil organic matter; its nature, its role in soil formation and in soil fertility. Oxford, Pergamon Press, 544 p.

LAPETITE D., 1970 – Antagonistic action of bacteria against wood-destroying fungi studied on wood. *Material und Organismen* 5 : 229-238.

MANGENOT F. and REISINGER O., 1972 – Lignolytic activity in soils. *In* : J. SZEGI, *Proceedings of the Symposium on Soil Microbiology.* 147-152.

MARTINEZ A..T and RAMIREZ C., 1979 – Study of the microfungal community of an andosol. *J. Ecol.* 67 : 305-319.

MOORE-LANDECKER E. and STOTSKY G., 1972 – Inhibition of fungal growth and sporulation by volatile metabolites from bacteria. *J. Microbiol.* 18 : 957-962.

NOBLES M.K., 1958 – A rapid test for extracellular oxidase in cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canad. J. Bot.* 36 : 91-99.

PEÑA-CABRIALES J.J et VALDES M., 1975 – Rhizosphère du sapin (*Abies religiosa*) I. Microbiologie et activité microbienne. *Revista Latinoamericana Microbiol.* 17 : 25-31.

RICARD J., 1977 – Experience with immunizing commensals. *Netherlands J. Plant Pathol.* 83 (suppl. 1) : 443-448.

SMITH R., 1975 – Economic aspects of bacteria in wood. *In* : W. LIESE, *Biological transformation of wood by microorganisms.* 89-102.

SWIFT M.J., HEAL O.W. and ANDERSON J.M., 1979 – Decomposition in terrestrial ecosystems. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 372 p.

TAYLOR J.B., 1971 – A selective medium for the isolation of Basidiomycetes from diseased roots, mycorrhizas, and soil. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 56 : 313-314.

CONTRIBUTION TO A STUDY OF MICROSCOPICAL FUNGAL FLORA OF MOROCCO. II – *ALTERNARIA ALTERNATA* : MICROSCLEROTIA AND CHLAMYDOSPORES

by N. AMRANI and L. NAJIM*

SUMMARY. – The fungus isolated from a dark brown spot disease, developed on post-harvested apples (var. Golden), was cultivated in vitro and identified to *Alternaria alternata* (Keissler).

In old and dessicated cultures, maintained on 2 % YE medium, resting stages such as microsclerotia and chlamydospores, were observed for the first time in this species.

RÉSUMÉ. – Le champignon isolé à partir d'une pourriture brun foncé trouvée sur des pommes (var. Golden), après leur récolte, a été cultivé in vitro et identifié à *Alternaria alternata* (Keissler).

Dans de vieilles cultures désséchées, sur 2% YE, on a observé, pour la première fois dans le cas de cette espèce, des formes de résistance telles que les microsclérotes et les chlamydospores.

KEY WORDS : *Alternaria alternata*, chlamydospores, microsclerotia.

INTRODUCTION

During investigations of microscopical microflora, and studies of incidencies of this latest on Rosaceous cultures, in Middle-Atlas at Oulmes, at 800 m of altitude (NAJIM & al., 1984), we found numerous, usual or not usual fungi in this area, with sometimes a particular behavior in field or in laboratory, such as *Alternaria alternata* Keissler.

Among species of *Alternaria* there are many which have been reported to produce sclerotia or chlamydospores naturally or in culture :

– *A. padwicki* forms sclerotia in culture (ELLIS, 1971).

– *A. raphani* produces chlamydospores in culture (TABER & VANTERPOOL, 1963). ATKINSON (1953) suggested that the survival of this fungus in

* Laboratoire de Mycologie, Faculté des Sciences, Av. Ibn Batota, B.P. 1014, Rabat, Maroc.

dry soil cultures for a long period (5 years) is related to the formation of these chlamydospores.

– *A. longissima* forms chlamydospores on natural as well as artificial substrats (ELLIS, 1971).

The chlamydospores of these species are produced by the rounding-up of a cell or cells of essentially vegetative hyphae.

– Concerning *A. porri* f. sp. *solani*, when normal conidia are placed in natural soil, chlamydospores form within single cells of these conidia (BASU, 1971).

– *A. brassicae* produces conidial chlamydospores too (TSUNEDA & SKOROPAD, 1976).

The purpose of this paper is to describe the formation under certain cultural conditions, of hyphal microsclerotia and intraconidial chlamydospores.

MATERIAL AND METHODS

Strain origin :

A wild strain (noted 1b) of *A. alternata* is used. It was got from infected apples collected from fields at Oulmes (Morocco).

This fungus was also found on apples 24h - 48h after their going out from cold stores, where they were deposed for a few months.

Cultures

Cultures are realized in sterilized Petri dishes on solid medium composed of : 2 % yeast extract, 2 % glucose solution, and 2 % agar solution.

These cultures are incubated at 25°C (± 1°C) for more than 3 months. Usually, they are maintained on 2 % potato dextrose agar or 2 % malt agar medium.

RESULTS

Several *Alternaria* species have been reported to cause rounded dark brown rots on Golden apples (Fig. 1), inciting then substantial reduction in crop yield and being above all, a serious challenge to the prolonged storage of the fruits at low temperatures.

The observation of a conidial suspension of the fungus, isolated from infected apples, shows pluricellular spores, borne in long chains in culture, the majority with three to five cross septa and within the limits of 21-36 x 9,5 µm. It concerns *A. alternata* Keissler (Fig. 2). This has been moreover confirmed by the CBS (Baarn).

This strain of *A. alternata* cultivated on 2 % YE medium at 25°C (± 1°C) presents, in the centre of at least one-month-old cultures, among vegetative

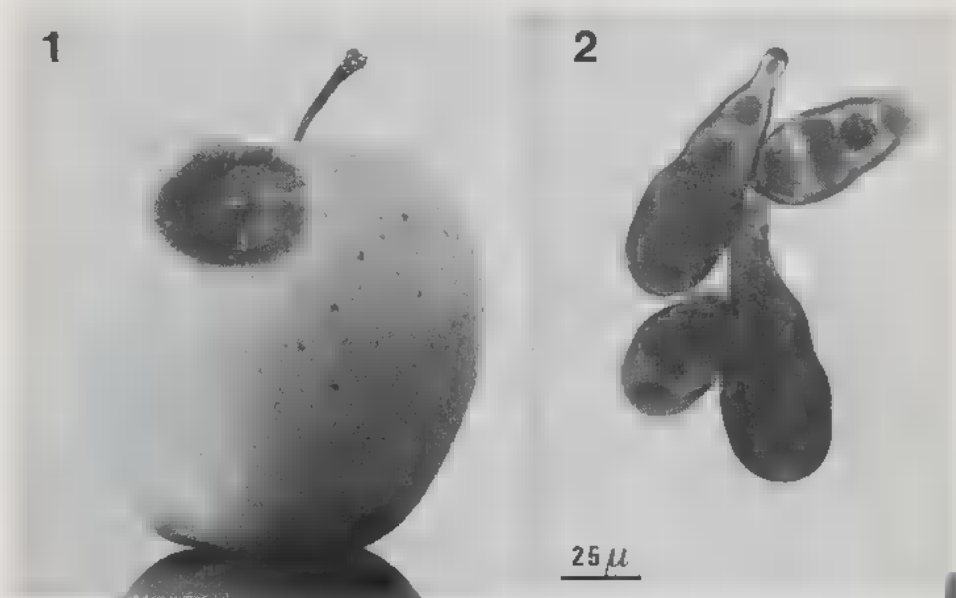


Fig. 1 : Apple (Var. Golden) presenting symptoms of alternariosis : a rounded dark brown and more or less large rot caused by *Alternaria alternata.*

Fig. 2 : Characteristical conidia of *A. alternaria* Keissler isolated from apple rot.

Fig. 1 : pomme (Var. Golden) présentant les symptômes d'une «alternariose» : pourriture arrondie de couleur brun foncé, causée par l'espèce *Alternaria alternata.*

Fig. 2 : Conidies caractéristiques d'*A. alternata* Keissler.

hyphae, pluricellular and at maturity, thick walled structures that are microsclerotia.

Young microsclerotia are formed initially by thin-walled cells that swell along hyphae (Fig. 3); then, several hyphae intermingle, the globose cells multiply and assembly (Fig. 4, 5), and their walls become thick and pigmented. Mature microsclerotia are firm, darkly pigmented, usually irregularly spheroidal and about 50 μm in diameter (Fig. 6).

When cultures are more than 3 months old they present, except for that hyphal microsclerotia, intraconidial chlamydospores (Fig. 7, 8). In these old cultures more or less desiccated, cytoplasm withdraws from some conidial cells and accumulates in one cell (Fig. 7), or two cells per conidium (Fig. 8), which develop thick cell walls and function as resting spores, or chlamydospores, that have about 4,5 μm in diameter. They are spherical and smaller than the cells within which they develop and their cell walls are transparent.

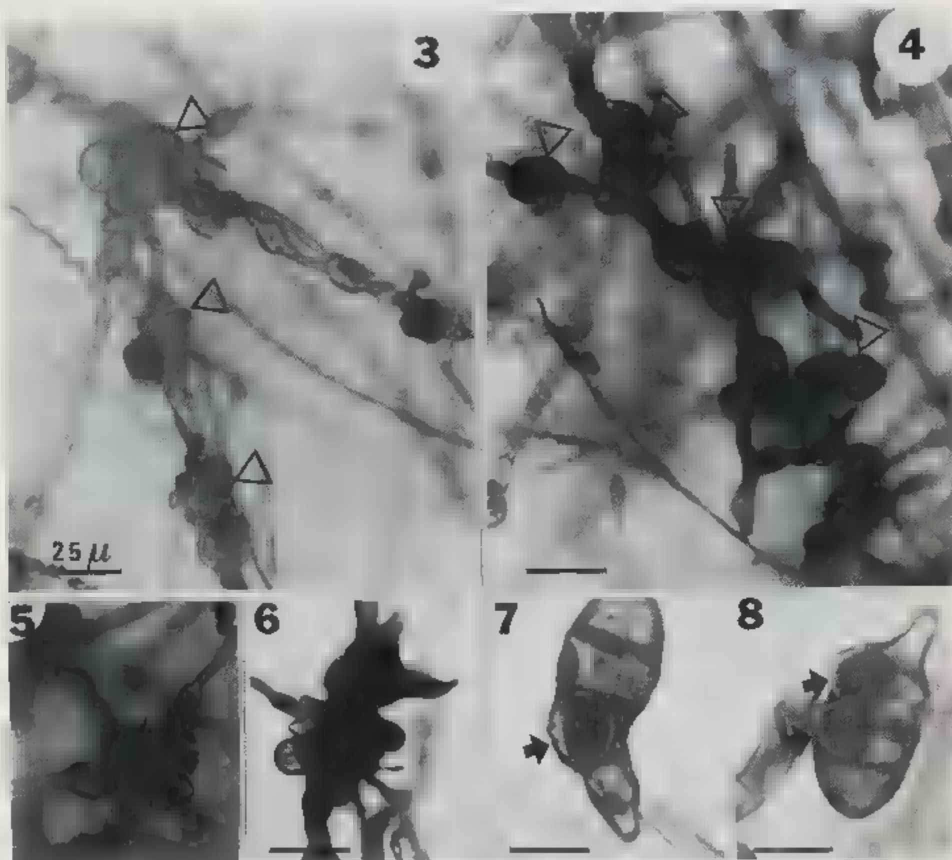


Fig. 3 : Initial stages in the formation of microsclerotia : Swollen hyphal cells more or less thin-walled and aggregated (arrows).

Fig. 4 : Globose cells of several intermingled hyphae aggregate and develop thick and pigmented cell walls (arrows).

Fig. 5 : Young microsclerotium consisting of less than 50 cells still identifiable.

Fig. 6 : Mature microsclerotium : firm and darkly pigmented.

Fig. 7 : *A. alternata* conidium presenting one endocellular rounded and thick-walled chlamydospore (arrow).

Fig. [redacted] : Two chlamydospores (arrows) inside [redacted] conidium.

Fig. 3 : Premières étapes dans la formation des microsclérotes : Cellules hyphales gonflées et plus ou moins aggrégées, à paroi relativement peu épaisse (flèches).

Fig. 4 : Des cellules gonflées de plusieurs hyphes entremêlées se rassemblent et développent des parois épaisses et pigmentées (flèches);

Fig. 5 : Microsclérote jeune constitué de moins de 50 cellules encore identifiables.

Fig. 6 : Microsclérote mûr : compact et pigmenté.

Fig. 7 : Conidie d'*A. alternata* présentant une chlamydospore arrondie et à paroi épaisse (flèche).

Fig. [redacted] : Deux chlamydospores intraconidiennes (flèches).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The fungus isolated from the black rots on apples is identified as *A. alternata*. Its incidence as a postharvested pathogen of stored fruits has increased in recent years as a result of efforts to take advantage of marketing opportunities by prolonging the storage of fruits in Morocco.

Near the centre of a fungal colony (developed from a germinating spore) hyphae may often anastomose by thin branches which grow towards each other, this being a preliminary to the development of microsclerotia.

Most sclerotia are firm, frequently rounded masses of hyphae with or without the addition of host tissue or soil, and normally having no spores in them (AINSWORTH, 1971).

Some of the smallest structures thus formed, consisting of a few cells and without cortex and medulla, are described as microsclerotia, these structures often arise as masses of swollen and aggregated cells among vegetative intermingled hyphae.

These cells multiply either by producing septa, or by budding like *Verticillium alboatrum* (BROWN & WYLLIE, 1970) or *Pleiochaeta setosa* (HARVEY, 1975).

ANDERSON (1976) suggested that these morphological changes may result from a partial inhibition of the apical growth, which is responsible of the regular tubular form of the filaments.

Relating to *Alternaria brassicae* (TSUNEDA & SKOROPAD, 1976), microsclerotia are different, for they are conidia which aggregate in firm masses, the morphological and functional characteristics of which (rounded and darkly pigmented structures, resistant to desiccation and freezing) confer them the attribution of the term.

TSUNEDA & SKOROPAD (1976) suggest that their formation occurred under conditions unfavourable for vegetative growth, and as these structures withstood the effects of desiccation and freezing they might have a potential importance in the survival of the fungus in nature.

These writers got as well, naturally and in culture, endocellular chlamydospores in response to cold temperature (0-3°C) and gradual desiccation. This indicated that chlamydospores have too an importance in the survival of the fungus.

BASU (1971) got intraconidial chlamydospores in the same conditions, but this was for *Alternaria porri* f. sp. *solani*.

Other fungi have been reported to respond to nutrient depletion by forming chlamydospores (*Fusarium* sp.) or sclerotia (*Rhizoctonia*).

Concerning *Alternaria alternata*, microsclerotia arise essentially from vegetative hyphae, in one-month-old cultures, on YE, stored at about 25°C and subjected to gradual desiccation. Chlamydospores, in return, are formed in conidial cells, in cultures older than in case of microsclerotia and subjected to the same physical conditions.

Therefore, both structures are produced in old cultures on YE, in the centre of the colonies where nutritive substances are depleted. Their existence may be the result of a nutrient exhaustion, which is among ■ wide range of environmental and internal factors, like cellular ageing with production of autotoxic substances, freezing (TSUNEDA & SKOROPAD, 1976), of high temperatures (MARIAT, 1964). However, it isn't exactly known if this mode of development is hormonally controlled. CHET & HENIS (1975) thought that internal as well as external factors influence the initiation and the subsequent development of sclerotia.

The differentiation of structures like microsclerotia and chlamydospores is a new phenomenon for the species *Alternaria alternata* Keissler. It might be an ecological characteristic, related to the adaptation of this pathogen to the Moroccan climate, and particularly to Oulmes thermic condition, that are about + 40°C in summer and less than 0°C in winter.

It probably represents the means by which the fungus withstands the adverse conditions. These resting stages can persist for several years in soil, and present serious obstacles to the eradication of the parasite.

REFERENCES

AINSWORTH G.C., 1971 — Dictionary of the fungi 6th ed. Kew (England), Commonw. Mycol. Inst.

ANDERSON J.G., 1976 — Temperature-induced fungal development. *In* : J.E. SMITH & D.R. BERRY, *Filamentous Fungi*. London, Edward Arnold Publ.: 358-362.

ATKINSON R.G., 1953 — Survival and pathogenicity of *Alternaria raphani* after five years in dried soil cultures. *Canad. J. Bot.* 31 : 542-547.

BASU P.K., 1971 — Existence of chlamydospores of *Alternaria porri* f. sp. *solani* as overwintering propagules in soil. *Phytopathology* 61 : 1347-1350.

BROWN M.F. and WYLLIE T.D., 1970 — Ultrastructure of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 60 : 538-542.

CHET I. and HENIS Y., 1975 — Sclerotial morphogenesis in fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13 : 169-192.

ELLIS M.B., 1971 — Dematiaceous hyphomycetes. Kew (England), Commonw. Mycol. Inst.

HARVEY I.C., 1975 — Development and germination of chlamydospores in *Pleiochaeta setosa*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 64 : 489-495.

MARIAT F., 1964 — Saprophytic and parasitic morphology of pathogenic fungi. *In* : H. SMITH & J. TAYLOR, *Microbial behaviour in vivo and in vitro*. London, Cambridge University Press : 85-111.

NAJIM L., CLAUZET J.P. and KADIRI M., 1984 — Contribution à l'étude de la flore fongique microscopique du Maroc - 1 - Le genre *Gonatobotrys*, quelques aspects physiologiques et morphologiques. *Cryptogamie, Mycol.* 5 : 109-120.

TABER R.A. and VANTERPOOL T.C., 1963 — *Alternaria* species on rape in western Canada. *Canad. Phytopathol. Soc. Proc.* 30 : 19.

TSUNEDA A. and SKOROPAD W.P., 1976 — Formation of microsclerotia and chlamydospores from conidia of *Alternaria brassicae*. *Canad. J. Bot.* 55 : 1276-1281.

ERRATUM :

Complément à l'article : «Contribution à l'étude de la flore fongique microscopique du Maroc - I - Le genre *Gonatobotrys* : quelques aspects morphologiques et physiologiques». *Cryptogamie, Mycol.* 1984 - 5 : 109-120.

«Les différentes espèces de *Gonatobotrys* sp. ont été déposées et répertoriées au Centraal bureau Voor Schimmelculture, sous les numéros suivants :

– *G. simplex*, CBS 466 84
– *G. africana*, CBS 465 84»

NOTE SUR DEUX *ENTOLOMATACEAE* (BASIDIOMYCETES, PLUTÉALES) NOUVELLES POUR LA FRANCE

par Régis COURTECUISSE*

RÉSUMÉ. — L'auteur signale pour la première fois en France *Entoloma farinogustus* Arnolds et Noordeloos, et *Rhodocybe melleopallens* Orton. Des descriptions macroscopiques et microscopiques de ces espèces sont données.

SUMMARY. — The author notes *Entoloma farinogustus* Arnolds et Noordeloos, and *Rhodocybe melleopallens* Orton for the first time in France. Macroscopic and microscopic descriptions of these species are given.

MOTS CLÉS : *Entolomataceae*, *Entoloma farinogustus*, *Rhodocybe melleopallens*, France, chorologie.

I. - *Entoloma farinogustus* Arnolds et Noordelos, *Persoonia* 10 : 292, 1979.

Nous avons récolté trois carpophores de cette espèce dans deux stations différentes de la même localité. Certaines différences ont pu être constatées par rapport au type hollandais de ce taxon, surtout sur le plan microscopique. Ces différences nous permettent d'élargir quelque peu les limites de la variabilité spécifique de cet *Entoloma*.

Description macroscopique (Fig. 1)

Chapeau hygrophane, largement étalé, plus ou moins convexe à retroussé (spécimens adultes bien développés); 7-10 mm de diamètre; ocre rosé séchant en grisâtre. Marge légèrement festonnée denticulée, un peu striolée par transparence. Cuticule lisse.

Lames assez serrées, légèrement ventrues, fortement émarginées. Arête entière, obtuse, concolore. Lames rose pâle, un peu grisâtre.

* 33 rue de Piètre, 59249 Aubers, France.

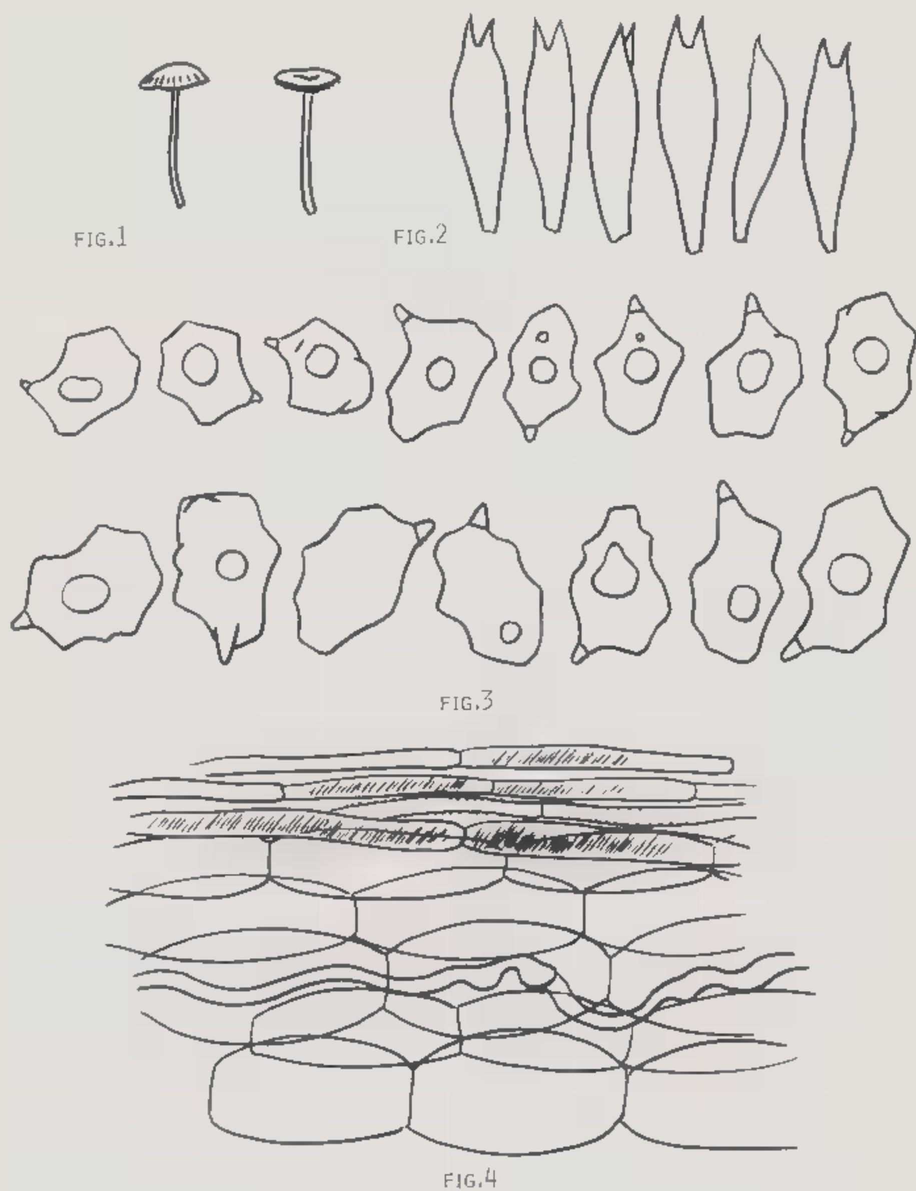


Fig. 1-4 : *Entoloma farinogustus* Arn. et Noord.; 1 : Carpophores; 2 : Spores; 3 : Basides; 4 : Cuticule.

Fig. 1-4 : *Entoloma farinogustus* Arn. et Noord.; 1 : Carpophores; 2 : Spores; 3 : Basidia; 4 : Cuticle.

Stipe fin, 15-20 x 1,5-2 mm, cylindracé plus ou moins flexueux en bas, de couleur pâle nettement jaunâtre sale, brunâtre à la base, lisse à plus ou moins ruguleux verticalement sous la loupe.

Chair subnulle.

Odeur légèrement fruitée, faible.

Saveur fortement farineuse.

Description microscopique

Spores allongées, de silhouette elliptique à assez courtes et trapues, 5-7gones, mesurant (9)-9,9-12,5 x 7,4-8,7 µm (récolte 84092803) ou 8,3-10-(10,8) x 5,8-7,5-(8,2) µm (récolte 84092802) (Fig. 2).

Basides 2-sporiques (Fig. 3) clavées, non bouclées, 20-40 x 5-15 µm.

Boucles nulles.

Sous-Hymenium subcelluleux ou tortueux, formé de cellules petites, irrégulières, plus ou moins ramifiées à globuleuses.

Trame subrégulière à hyphes allongées, plus ou moins renflées, x 6,5-15 µm.

Pleurocystides et cheilocystides nulles.

Laticifères présents sur la récolte 84092802, assez rares dans la trame, assez localisés, x 5-11 µm, présents aussi dans la cuticule.

Cuticule formée d'un épicutis mince, d'hyphes fines couchées, reposant sur un subcutis devenant rapidement subcelluleux en profondeur à hyphes courtes et épaisses, subglobuleuses (Fig. 4).

Pigment très pâle, vacuolaire dans les hyphes superficielles, et très subtilement incrustant surtout sur les hyphes fines intermédiaires entre l'épicutis et le subcutis, ce dernier type de pigmentation disparaissant sur exsiccatum.

Remarque : Les lames du n° 84092803 étaient envahies par place, par un chevelu inextricable, provenant d'un champignon imparfait. Ce début de dégradation de notre matériel s'accompagnait d'une légère modification de certaines cellules marginales au niveau des lames, leur donnant un aspect de cheilocystides.

Récoltes :

– Basse-Forêt de Desvres (Pas-de-Calais). Dans les sphaignes d'une bétulaie à osmondes (deux carpophores), le 28.09.84; Leg. et Det. : Courtecuisse; n° 84092802.

– Même localité; hors des sphaignes sous feuillus hygrophiles; le 28.09.84; n° 84092803; Leg. et Det. : Courtecuisse.

Discussions

Les clés de NOORDELOOS (1980) nous amènent sans aucune difficulté sur *Entoloma farinogustus* Arnolds et Noordeloos. Cependant, ces récoltes posent quelques problèmes intéressants.

Le n° 84092802 possède des spores bien plus petites que le type décrit par ARNOLDS & NOORDELOOS : sp. 9-12-(12,4) x 6,9-8,2-(9,5) µm; de plus

l'habitat est très différent, sinon opposé, au moins sur le plan du régime hydrique du substrat. Le type est décrit de Hollande «on raw humus of *Calluna vulgaris* and grasses in grass heath on poor acid, dry sand *(Violion caninae)*». Le seul point commun avec l'écologie de notre récolte est l'acidophilie, car nos échantillons venaient au beau milieu d'énormes tapis de sphaignes dans une tourbière.

La récolte n° 84092803 a des spores plus conformes à la description princeps. L'habitat est ici aussi hygrophile.

De plus, ces récoltes présentent quelques autres différences par rapport au type hollandais. Les lames présentent un reflet grisâtre discret alors que ARNOLDS & NOORDELOOS (1979) écrivent : «haud griseo- vel brunneo tinctae». L'épicutis montre une très légère pigmentation membranaire visible seulement sur le frais alors que les auteurs hollandais ne signalent qu'une pigmentation vacuolaire.

Parmi ces différences, celles concernant la taille des spores et l'écologie nous semblent les plus importantes.

Néanmoins, comme nous ne disposons que de trois carpophores, dont un vieillissant et parasité par un champignon imparfait, il nous semble prématuré de proposer un nouveau taxon basé sur ces particularités.

De plus, le Dr. M.E. NOORDELOOS (Leiden - NL), consulté à ce sujet, nous a répondu que le type de pigmentation est bien celui du groupe d'*E. cetratum*. Selon ce même auteur, *Entoloma farinogustus* n'étant connu que de quelques stations, on peut penser que l'on ne dispose pas encore d'assez de matériel pour juger de la variabilité potentielle complète de cette espèce, variabilité qui pourrait être parallèle à celle de *E. cetratum*, en particulier sur le plan écologique.

Nous nous contenterons donc, pour le moment, de donner *Entoloma farinogustus* Arnolds et Noordeloos comme espèce nouvelle pour la France, en signalant une amplitude écologique et une variabilité des tailles sporales supérieures à ce que l'on connaissait jusqu'à présent. Cependant, si à la lumière de nouvelles récoltes, une corrélation pouvait être établie entre la microscopie et l'hygrophilie de l'habitat de certains spécimens, ce problème, nous semble-t-il, pourrait être reconsidéré.

2. - *Rhodocybe melleopallens* Orton, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 43 : 380, 1960.
= *Collybia nitellina fo. minor* Døssing, *Friesia* 6 : 340, 1961 *(nom. nud.)*

Description macroscopique (Fig. 5) (un seul exemplaire récolté)

Chapeau plat, étalé, à marge plus ou moins retroussée (spécimen adulte), plus ou moins mamelonné, hygrophane radialement autour du mamelon, 32 mm de diamètre; brun orangé à mamelon légèrement plus ocre-jaunâtre en séchant. Marge entière à denticulée, fissile, striée. Cuticule viscidule, ruguleuse radialement.




FIG.5

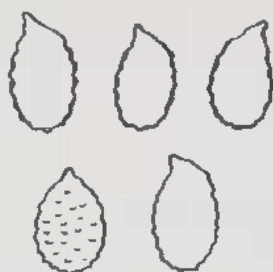


FIG.6

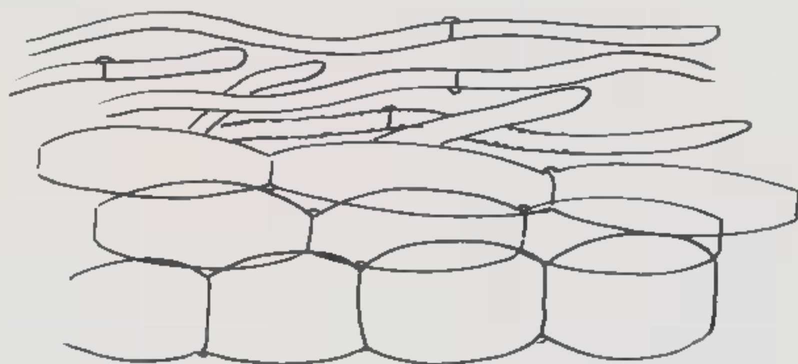


FIG.7

Fig. 5-7 : *Rhodocybe melleopallens* Ort.; 5 : Carpophore et coupe; 6 : Spores; 7 : Cuticule.
Fig. 5-7 : *Rhodocybe melleopallens* Ort.; 5 : Carpophore and section; 6 : Spores; 7 : Cuticle.

Lames espacées, ventrues-horizontales jusqu'au pied, avec une faible dent de décurrence, faiblement crispées verticalement sur les faces. Arête entière concolore. Couleur beige ocré pâle avec un reflet rosâtre douteux.

Stipe 35 x 2-5 mm, nu, cylindracé, aminci vers la base, à surface plus ou moins bosselée. Couleur brun orangé foncé.

Chair concolore ou plus pâle.

Odeur très forte de farine et même de concombre, tournant très nettement au miel mêlé de cire d'abeille.

Saveur de farine rance.

Description microscopique

Spores elliptiques asymétriques avec une légère dépression supra-apiculaire inconstante, très petites, 5-6,6 x 3-3,5 µm, souvent allongées, parfois trapues,

montrant de nombreuses petites facettes en vue polaire, noduleuses (Fig. 6).

Basides 4-sporiques, petites, clavées, 16-22 x 6-6,5 µm.

Pleurocystides et cheilocystides nulles.

Boucles abondantes dans toutes les parties du carpophore.

Sous-hyménium confus, formé de petites cellules empilées, plus ou moins chiffonées, irrégulièrement subcelluleux, assez épais, jusque 15 µm.

Trame subparallèle, formée d'hyphes assez épaisses, boudinées.

Laticifères non observés.

Présence de nombreuses concrétions cristallines dans la trame et dans la cuticule, polygonales à étoilées (vraisemblablement liées à l'habitat littoral).

Cuticule formée d'un épicutis fin d'hyphes grêles allongées mêlées à quelques hyphes plus courtes et redressées, reposant sur un subcutis d'hyphes épaisses allongées boudinées, se racourcissant au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans la chair (Fig. 7).

Pigment pâle, incrustant sur les hyphes intermédiaires entre l'épicutis et le subcutis.

Récolte

– Brighton (Somme) Cayeux; Bois sablonneux sous *Pinus*, *Ligustrum*, *Rosa*, etc.; le 31.10.84; Leg. : G. Trigaux, Det. : Courtecuisse; n° 84103109.

Discussion

Cette récolte correspond de façon très satisfaisante aux descriptions d'ORTON (1960); de DØSSING (1961), de PEGLER & YOUNG (1975), de MOSER (1978), d'HORAK (1978), de WINTERHOFF (1981) et celle plus récente de NOORDELOOS (1983). L'habitat est également très conforme.

Cette espèce qui était connue de Grande-Bretagne, des Pays-Bas, du Danemark (NOORDELOOS, l. c.) et d'Allemagne (WINTERHOFF, 1981) est nouvelle pour la mycoflore française.

REMERCIEMENTS : Nous tenons à remercier très vivement M.E. NOORDELOOS (Leiden, NL) qui a bien voulu confirmer notre détermination de *Entoloma farinogustus* et nous donner son avis sur la variabilité de cette espèce.

BIBLIOGRAPHIE

ARNOLDS E.J.M. and NOORDELOOS M.E., 1979 – New taxa of *Entoloma* from grasslands in Drenthe, The Netherlands. *Persoonia* 10 : 283-300.

DØSSING L., 1961 – Nogle for Danmark nye eller sjaeldne bladhatte. *Friesia* 6 : 335-341.

HORAK E., 1978 – Notes on *Rhodocybe* Maire. *Sydowia* 31 : 58-80.

MOSER M., 1978 — Die Röhrlinge und Blätterpilze. *In* : GAMS W., *Kleine Kryptogamenflora*, 4 Ed., Band IIb/2, Stuttgart, 532 p.

NOORDELOOS M.E., 1980 — *Entoloma* subgenus *Nolanea* in the Netherlands and adjacent regions with a reconnaissance of its remaining taxa in Europe. *Persoonia* 10 : 427-534.

NOORDELOOS M.E., 1983 — Notulae ad Floram Agaricinam Neerlandicam - I-III. *Marasmiellus, Macrocystidia* and *Rhodocybe*. *Persoonia* 12 : 29-49.

ORTON P.D., 1960 — New check-list of British agarics and boleti. Part III. Notes on genera and species in the list. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 43 : 159-439.

PEGLER D.N. and YOUNG T.W.K., 1975 — Basidiospore form in the British species of *Clitopilus, Rhodocybe* and *Rhodotus*. *Kew Bull.* 30 : 19-32.

WINTERHOFF W., 1981 — Bemerkenswerte Pilzfunde in Nordbaden. *Südwestdeutschl. Pilzrundschau* 17 : 10-11.

Source : MNHN, Paris

ESTUDIO DE ALGUNAS ESPECIES CON ESPORAS OBLONGAS DEL GENERO *BOVISTA* PERS.

por A. ORTEGA y A. Gª. BUENDIA*

RESUMEN. — Se realiza un estudio macro y microscópico (microscopio óptico y de barrido) de tres especies del género *Bovista* Pers. : *Bovista longispora* Kreisel, *Bovista oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley y *Bovista promontorii* Kreisel. Como resultado del cual se propone *Bovista oblongispora* (C.G.Lloyd) Bottomley var. *longispora* (Kreisel) Ortega & Gª. Buendía comb. & stat. nov.

RÉSUMÉ. — Étude macroscopique et microscopique (microscope optique et à balayage) de trois espèces du genre *Bovista* Pers. : *Bovista longispora* Kreisel, *Bovista oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley et *Bovista promontorii* Kreisel. Proposition de *Bovista oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley var. *longispora* (Kreisel) Ortega & Gª. Buendía comb. & stat. nov.

SUMMARY. — Three species of *Bovista* with oblong spores : *B. longispora* Kreisel, *B. oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley and *B. promontorii* Kreisel macro and microscopically (optical microscope and SEM) are studied. A new combination and status are proposed : *Bovista oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley var. *longispora* (Kreisel) Ortega & Gª. Buendía comb. & stat. nov.

MOTS CLÉs : *Bovista*, Systématique, Espagne.

INTRODUCCION

En 1967 KREISEL en su monografía sobre el género *Bovista* distingue tres especies con esporas oblongo-elipsoidales :

Bovista longispora Kreisel (= *Lycoperdon oblongisporum* Berk. & Curt.) con capilicio de tipo 'Lycoperdon' medianamente porado y esporas lisas.

Bovista oblongispora (C.G. Lloyd) Bottomley (= *Bovistella oblongispora* C.G. Lloyd) con capilicio de tipo 'intermedio', sin poros y esporas lisas.

Bovista promontorii Kreisel con capilicio de tipo 'intermedio', con poros y esporas lisas a punteadas.

En 1975 CALONGE & DEMOULIN también estudiaron algunas recolectas que respondían a estas características y que asimilaron al grupo *Lycoperdon crocatum* Pat. - *Lycoperdon oblongisporum* Berk. & Curt.

* Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Granada. España.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptogamie, Mycol.)*, TOME 6 (1985).

En el año 1982 uno de nosotros (BUENDIA, 1985) inició un trabajo de investigación sobre los *Gasteromycetes* de Andalucía (España), en el cual se estudió abundante material del género *Bovista* Pers. De entre dicho material nos llamó poderosamente la atención algunas recolectas que presentaban esporas oblongas y que se identificaron como *B. promontorii* Kreisel.

Dada la complejidad de este grupo, nos animamos a estudiarlo en profundidad, para lo cual pedimos el material tipo correspondiente para compararlo con el material español y tratar de aclarar este complejo grupo de especies. Así pudimos comprobar que *B. longispora* Kreisel, que su autor definía, entre otros caracteres, por su capilicio tipo 'Lycoperdon', lo presentaba en realidad de tipo 'intermedio' (Figs. 7 y 8), lo que aproxima a *B. oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley, separándose únicamente por la presencia de poros en el capilicio y sus esporas algo más elipsoidales (Fig. 2). Es por esto por lo que consideramos que ambos taxones constituyen una misma especie : *B. oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley, en la que, no obstante, pueden distinguirse dos variedades : *B. oblongispora* var. *oblongispora* y *B. oblongispora* var. *longispora* (Kreisel) Ortega & Gª. Buendía, comb. & stat nov.

MATERIAL Y METODO

Parte del material estudiado procede de diversas localidades de la provincia de Málaga y se encuentra depositado en el herbario del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias de Granada (GDAC). El resto del material de *B. promontorii* así como el de *B. longispora* y *B. oblongispora* nos fue remitido de los herbarios de Uppsala, Kew y Maryland respectivamente.

El estudio microscópico se ha realizado preferentemente en una solución de KOH al 10 %, utilizando para ello un microscopio ZET binocular con luz incorporada marca ZEISS. El estudio al M.E.B. se ha realizado en el Real Jardín Botánico de Madrid.

Como bibliografía básica hemos utilizado : KRIESEL (1967), BOTTOMLEY (1948) y CALONGE & DEMOULIN (1975).

DESCRIPCION DE ESPECIES

***Bovista oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley, *Botbalia* 4 : 580 (1948).**
≡ *Bovistella oblongispora* C.G. Lloyd, *Mycol. Notes* 5 : 362 (1917)

Carpóforos globosos a subglobosos de 1,7-1,8 cm de diámetro y provistos de una pequeña base miceliana que no llega a diferenciarse en rizomorfo. Peridio doble : exoperidio formado por pequeños aguijones aislados de aprox. 0,5 mm, constituidos por hifas y esferocistos de 26-28 µm con paredes coloreadas de 1-1,5 µm; endoperidio castaño a marrón chocolate, membranoso y muy delgado. Gleba pulverulenta de color pardo amarillento a castaño oscuro. Subgleba pardo amarillenta, compacta y de 2-3 mm de longitud.

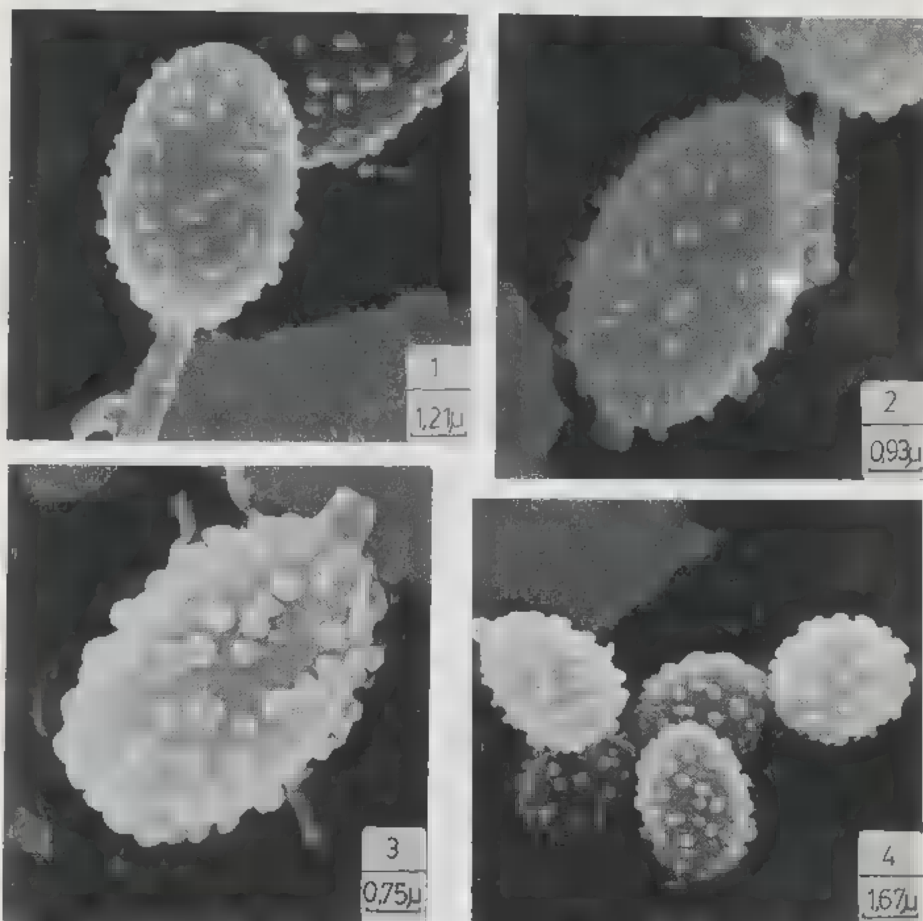
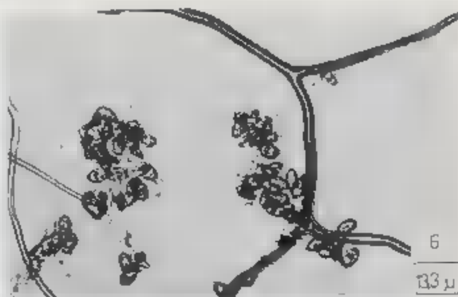


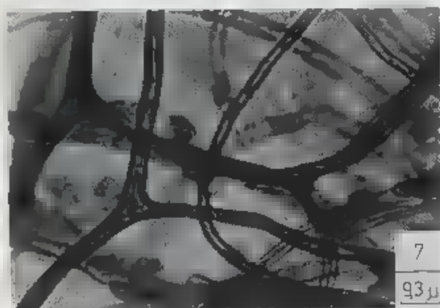
Fig. 1 — *Bovista oblongispora* : esporas al M.E.B. (Material tipo). Fig. 2 — *Bovista longispora* : esporas al M.E.B. (Material tipo). Fig. 3 — *Bovista promontorii* : esporas al M.E.B. (Material tipo). Fig. 4 — *Bovista promontorii* : esporas al M.E.B. (GDAC 21752).

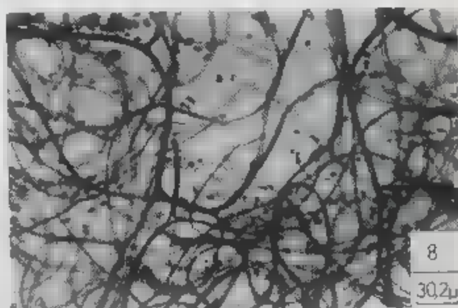
Capilicio de tipo 'Lycoperdon - Intermedio' (Figs. 5, 6, 7 y 8), marrón oscuro, elástico, con abundantes ramificaciones, estando constituido por hifas de 2-6 µm de diám. con paredes de 0,5-1,5 µm. Poros, cuando presentes, puntiformes, de contorno regular y de abundancia media. Sin tabiques o escasamente tabicado.

Esporas de 5,5-7,5 x 2,8-4,8 µm, pardo amarillentas, oblongo-elipsoidales, con contenido lipídico y lisas al Microscopio óptico. Al M.E.B. se observa una ornamentación constituida de pequeñas verrugas medianamente densas y de 0,1 µm (Figs. 1 y 2). Restos de esterigma siempre presentes y bien conservados de 0,5-4 µm de longitud.











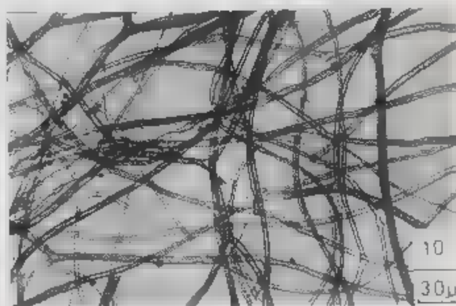


Fig. 5 – *Bovista oblongispora* : Capilicio al M.O. (Material tipo). Fig. 6 – *Bovista oblongispora* : capilicio al M.O. (Material tipo). Fig. 7 – *Bovista longispora* : capilicio al M.O. (Material tipo). Fig. 8 – *Bovista longispora* : capilicio al M.O. (Material tipo). Fig. 9 – *Bovista promontorii* : capilicio al M.O. (Material tipo). Fig. 10 – *Bovista promontorii* : capilicio al M.O. (Material tipo).

Esta especie incluye dos variedades :

– *Bovista oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley (1948) var. *oblongispora*

Capilicio (Figs. 5 y 6) sin poros. Esporas oblongas que poseen un resto de esterigma de 3-3,5-4 μm de longitud. (Figs. 1, 5 y 6).

Medidas esporales :

X = 6-7 x 3,5-(4,2) $\overline{X}_{100}$ = 6,675 x 3,94

$Q = 1{,}375\text{-}2$ $\bar{Q} = 1{,}694$
$\sigma_{(n-1)} = 0{,}413 \times 0{,}2094$

Material estudiado : Typus : Holotypus LLO 30.756, vidi.

– *Bovista oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley (1948) var. *longispora* (Kreisel) Ortega & Gª. Buendía comb. & stat. nov.

≡ *Bovista longispora* Kreisel, Taxonomisch-Pflanzengeographische Monographie der Gattung *Bovista. Beih. Nova Hedwigia* 25 : 75 (1967).

= *Lycoperdon oblongisporum* Berk. & Curt., *J. Linn. Soc., Bot.* 10 : 345 (1869) non *Bovista oblongispora* (C.G. Lloyd) Bottomley.

= *Lycoperdon ericetorum* Pers. var. *oblongisporum* (Berk. & Curt.) Perdeck, *Blumea* 6 : 496 (1950).

Capilicio 'Lycoperdon - Intermedio' con poros puntiformes de contorno regular y de abundancia media (Figs. 7 y 8). Esporas elipsoidales que poseen un resto de esterigma de hasta 0,5 µm (Fig. 2).

Medidas esporales :
$X = 5{,}5\text{-}7{,}5 \times 2{,}8\text{-}3{,}2$ $\bar{X}_{100} = 6{,}071 \times 3{,}058$
$Q = 1{,}718\text{-}2{,}5$ $\bar{Q} = 1{,}98$
$\sigma_{(n-1)} = 0{,}38 \times 0{,}127$

Material estudiado : Typus : Holotypus K, vidi.

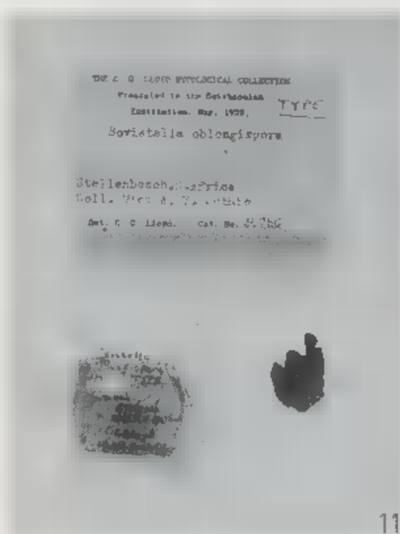
Observaciones : Como puede comprobarse en las Figuras 5, 6, 7 y 8 el capilicio de este taxon es muy semejante al de la especie tipo, variando sólo en la mayor abundancia de poros; en cuanto a las esporas (Figs. 1 y 2) también puede observarse su gran parecido, diferenciándose únicamente en que el caso de la var. *longispora* éstas son algo más elipsoidales y generalmente apediceladas. Es por estas razones por lo que pensamos que no existen caracteres suficientes para separar dos especies, y por lo que proponemos la combinación y cambio de status antes reseñados.

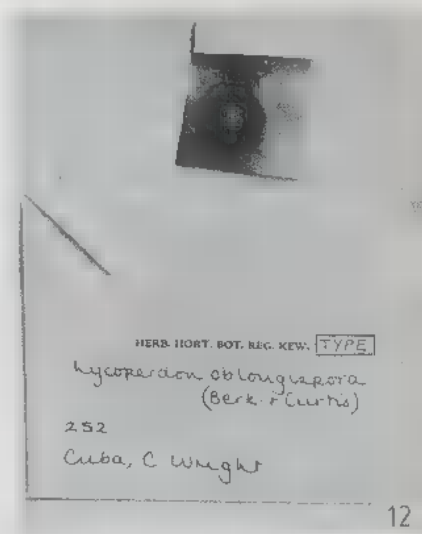
***Bovista promontorii* Kreisel, Taxonomisch - Pflanzengeographische Monographie der Gattung *Bovista. Beih. Nova Hedwigia* 25 : 225 (1967).**

= *Lycoperdon polymorphum* Vitt. sensu Bottomley, *Bothalia* 4 : 557 (1948), non *Lycoperdon polymorphum* Vitt. (1843).

= *Lycoperdon oblongisporum* Berk. & Curt. sensu Lloyd, *Mycol. Notes* 2 : 235 (1905) pro parte; non *Lycoperdon oblongisporum* Berk. & Curt. (1869).

Carpóforos globosos a subglobosos de 2-3 cm de altura por 1,5-2,5 cm de anchura y provistos de un rizomorfo de desarrollo variable. Peridio doble : exoperidio formado por aguijones de color pardo amarillento que tienden a hacerse verrugosos en la madurez, constituidos por hifas y esferocistos de hasta 26 µm con paredes de 1-1,5 µm o sólo por hifas (dependiendo del grado de maduración de los carpóforos); endoperidio pardo amarillento, membranoso y muy





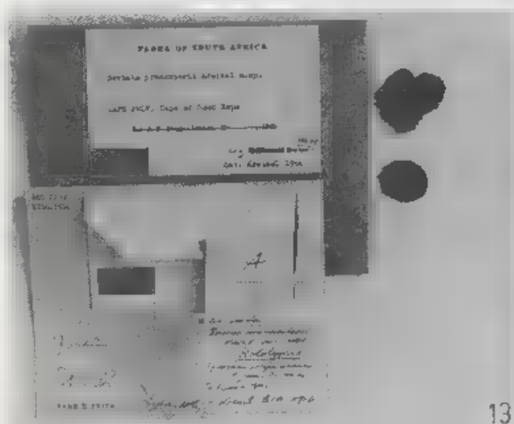




Fig. 11 — *Bovista oblongispora* : tipo. Fig. 12 : *Bovista longispora* : tipo. Fig. 13 : *Bovista promontorii* : tipo. Fig. 14 — *Bovista promontorii* : GDAC 21752.

delgado. Gleba pulverulenta de color pardo oliváceo. Subgleba pardo amarillenta, compacta y de desarrollo variable.

Capilicio marrón, elástico, con abundantes ramificaciones y de tipo 'Lycoperdon - Intermedio' (Figs. 9 y 10), constituido por hifas de 3-8 µm de diámetro con paredes de 0,5-1 µm. Poros abundantes, puntiformes y de contorno regular. Tabiques muy escasos. En las hifas periféricas, de menor diámetro, los poros

son regulares, de mayor tamaño y más abundantes, de igual modo la tabicación en estas hifas es más frecuente.

Esporas pardo amarillentas, elipsoidales a ovoidales (Fig. 3 y 4), sublisas, con ornamentación muy suave constituida por verrugas bastante densas que no sobrepasan las 0,2 μm de longitud (Figs. 3 y 4) y con contenido lipídico. Restos de esterigma siempre presentes, bien conservados y de hasta 0,5 μm de longitud.

Medidas esporales :

Material tipo :

$X = 5\text{-}6 \times 3\text{-}4{,}2$	$\overline{X}_{100} = 5{,}507 \times 3{,}895$
$Q = 1{,}25\text{-}1{,}71$	$\overline{Q} = 1{,}41$
$\sigma_{(n-1)} = 0{,}407 \times 0{,}358$	

GDAC 21752 :

$X = 4\text{-}6 \times 3{,}2\text{-}4$	$\overline{X}_{100} = 5{,}019 \times 3{,}53$
$Q = 1{,}14\text{-}2$	$\overline{Q} = 1{,}42$
$\sigma_{(n-1)} = 0{,}675 \times 0{,}38$	

Material estudiado : Typus : Holotypus UPS, vidi; Los Reales de Genalguacil, Málaga, Leg. J. Guerra, 30-11-1983, bajo *Abies pinsapo* Boiss. GDAC 21752; Camino de Comares, cerca de la venta Galwey, Málaga, leg. A. Ortega & A.Gª. Buendía, 13-12-1984, lugares aclarados, GDAC 21834; Camino de Comares, cerca de la venta Galwey, Málaga, Leg. A. Ortega & A.Gª. Buendía, 13-12-1984, bajo *Quercus suber* L. GDAC 21883.

Observaciones : Según KREISEL (1967) esta especie se caracteriza, además de por su capilicio y esporas, por poseer un exoperidio constituido exclusivamente por hifas. Nosotros hemos podido comprobar, al igual que CALONGE & DEMOULIN (1975), que este último carácter es muy variable e inconstante dependiendo del grado de maduración del basidiocarpo. Es por esto por lo que creemos que el material recolectado en España, aunque presente esferocistos en el exoperidio, corresponde con *B. promontorii* Kreisel, ya que sus caracteres relativos a capilicio y esporas, que consideramos mucho más válidos y constantes que los que se refieren al exoperidio, coinciden perfectamente con los del material tipo de la especie descrita por este autor.

En cuanto a su posición taxonómica hemos de decir que, a pesar de su proximidad con *B. oblongispora* var. *longispora*, su morfología esporal (la relación media longitud anchura en *B. promontorii* es 1,42, mientras que en *B. oblongispora* var. *longispora* es 1,98) así como la ornamentación esporal más grosera y densa (Figs. 3 y 4) en *B. promontorii* nos separa estos dos taxones, aunque no descartamos la posibilidad de que ambos se traten simplemente de variedades de una misma especie.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestra gratitud a los Directores de los Herbarios de Uppsala (UPS), Kew (K) y Maryland por el envío del material tipo de *B. promontorii*, *Lycoperdon oblongisporum* y *Bovistella oblongispora* respectivamente. De igual modo queremos agradacer al Dr. Calonge (Real Jardín Botánico, Madrid) la realización de las fotografías al M.E.B. que aparecen en el presente trabajo, y al Sr. Garciá Luna por su labor mecanográfica.

BIBLIOGRAFIA

BOTTOMLEY A.M., 1948 — Gasteromycetes of South Africa. *Bothalia* 4 : 473-810.

BUENDIA A.Gª., 1985 — Estudio taxonómico, morfológico, corológico y ecológico de los Gasteromycetes (Basidiomycotina) de Andalucía. Mem. Licenciatura (Ined.). Univ. Granada. 128 p.

CALONGE F.D. et DEMOULIN V., 1975 — Les Gastéromycètes d'Espagne. *Bull. Soc. Mycol. France* 91 : 247-292.

KREISEL H., 1967 — Taxonomisch - Pflanzengeographische Monographie der Gattung *Bovista*. *Beih. Nova Hedwigia* 25 : VIII + 244 p. + 70 fig.

A PROPOS DE LA NOMENCLATURE DE DEUX MICROMYCETES : *CERATOCYSTIS FAGI* (LOOS) C. MOREAU ET *EUTYPA ARMENIACAE* HANSF. ET CARTER

par J. PACLT*

RÉSUMÉ. – *Ceratocystis fagi* (Loos) C. Moreau (improprement appelé précédemment *C. fagi* (Loos) Paclt) est synonyme de *C. piceae* (Münch) Bakshi. Les anamorphes décrits par LOOS peuvent être rapportés aux formes de UPADHYAY & KENDRICK.

Eutypa armeniacae Hansf. et Carter n'est pas synonyme d'*Eutypella prunastri* (Pers. ex Fr.) Sacc. comme il avait été antérieurement suggéré, mais a été récemment rapporté à *Eutypa lata* (Pers. ex Fr.) Tul.

SUMMARY. – *Ceratocystis fagi* (Loos) C. Moreau (improperly previously named *C. fagi* (Loos) Paclt) is synonymous with *C. piceae* (Münch) Bakshi. The anamorphs described by LOOS can be related to the forms of UPADHYAY & KENDRICK.

Eutypa armeniacae Hansf. and Carter is not a synonymous with *Eutypella prunastri* (Pers.. ex Fr.) Sacc. as it was previously suggested, but has been recently related to *Eutypa lata* (Pers. ex Fr.) Tul.

MOTS CLÉS : *Ceratocystis fagi, Ceratocystis piceae, Eutypa armeniacae, Eutypella prunastri, Eutypa lata.*

1. - *Ceratocystis fagi* (Loos) C. Moreau

En 1932, LOOS a décrit une espèce nouvelle, *Ceratostomella fagi,* sur bois de hêtre, qu'il estimait différente du *C. piceae* Münch. Lors de notre étude de la mycoflore du bois de hêtre (PACLT, 1954a-b) nous avons signalé et figuré cette espèce en l'appelant *Ceratocystis fagi* (Loos) Paclt (PACLT, 1954a). Or, la priorité de nomenclature en revient à MOREAU (1952) et la dénomination correcte serait *Ceratocystis fagi* (Loos) C. Moreau.

Cependant, les spécialistes du genre *Ceratocystis* tels que HUNT (1956) et UPADHYAY (1981) estiment que *C. fagi* est synonyme de *C. picea* (Münch)

* Institut de Phytopathologie et d'Entomologie expérimentales, Académie Slovaque des Sciences. CS-900 28 Ivanka pri Dunaji (Tchécoslovaquie).

Bakshi. BUTIN (1984) nous a confirmé cette identité; il a d'ailleurs récemment trouvé cette espèce sur *Nothofagus* au Chili (BUTIN & AQUILAR, 1984).

Le tableau I résume les caractéristiques de ces diverses récoltes telles qu'elles ont été rapportées par les auteurs.

Espèces	*Ceratocystis fagi* selon LOOS (1932)	*Ceratocystis piceae* selon LOOS (1932)	*Ceratocystis piceae* selon BUTIN & AQUILAR (1984)
Plante-hôte	*Fagus*	*Picea*	*Nothofagus*
Périthèces, diamètre	135-220	190-225	100-230
Col, longueur	860-1920	1060- -1500- -1970	900-1800
Col, diamètre à la base	19-36	32	25-40
au sommet	6-11	14-16	10-20
Hyphes ostiolaires, longueur	12-58	10,7-21,4	10-25
Hyphes ostiolaires, largeur	1-2	2,4-3,2	1
Ascospores, longueur	2,5- -3,5- -4	2,3-4,6	3,5-4,5
Ascospores, largeur	0,7- -1,0- -1,2	1,6	1-2

Tableau I. – Caractères microscopiques (en µm) du *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi.

Table I. – Microscopic characters (µm) of *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi.

Ainsi que le soulignent UPADHYAY & KENDRICK (1975), les anamorphes de cette espèces appartiennent aux genres *Pesotum* (la plus fréquente), *Sporothrix* et *Hyalodendron*, ce qui correspondrait respectivement aux formes *Graphium* et *Leptographium, Cephalosporium, Cladosporium* décrites par LOOS (1932).

Rappelons que, selon BUTIN & ZIMMERMANN (1972), deux autres espèces de *Ceratocystis* peuvent attaquer le bois de hêtre.

2. - *Eutypa armeniacae* Hansf. et Carter (CARTER, 1957)

Dès 1973, nous avions mis en doute la validité spécifique de l'*Eutypa armeniacae* Hansf. et Carter (PACLT, 1973) : son substrat (bois d'abricotier), les dimensions de ses asques et ascospores, son anamorphe *Cytosporina* nous laissaient supposer une identité avec l'*Eutypella prunastri* (Pers. ex Fr.) Sacc.

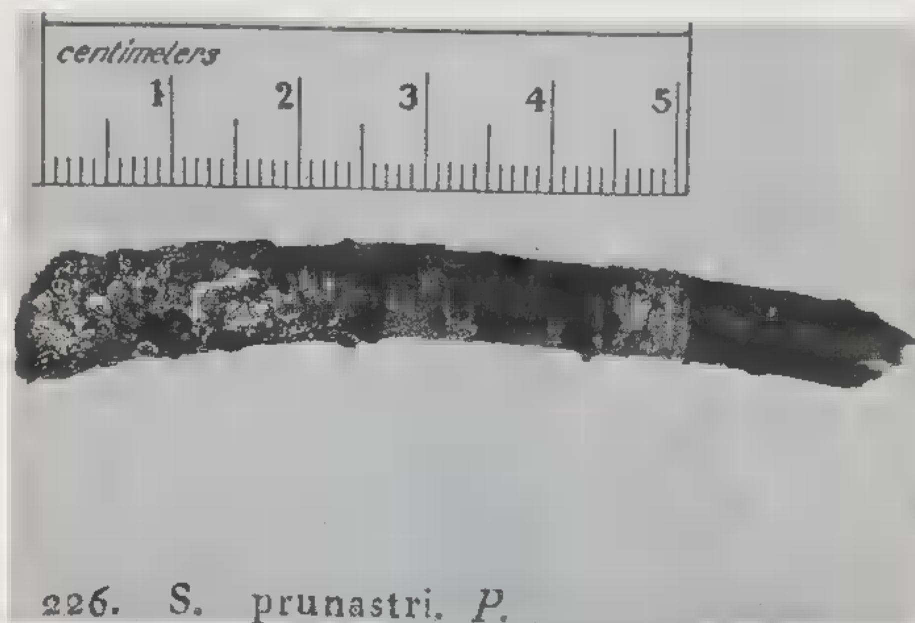


Figure 1. — Le type d'*Eutypella prunastri* (Pers. ex Fr.) Sacc., dans l'Herb. FRIES à Upsal (UPS), *Scleromyceti Sueciae*, No 226. (Dr L. HOLM dedit).

Figure 1. — Typus *Eutypella prunastri* (Pers. ex Fr.) Sacc., Herbarum FRIES, Upsal (UPS), *Scleromyceti Suecia*, no 226 (Dr L. HOLM dedit).

Lennart HOLM a eu l'amabilité, en 1980, d'examiner à Upsal l'échantillon d'*E. prunastri* déposé à l'herbier de FRIES (Scleromyceta Suecia, n° 226, fig. 1) : ses ascospores sont colorables par le bleu d'aniline tandis que celles de l'*E. armeniacae* ne le sont pas. Il s'agit donc de deux espèces différentes.

Par contre, GLAWE & ROGERS (1982) ont rapproché l'*E. armeniacae* d'une espèce fort banale : *Eutypa lata* (Pers. ex Fr.) Tul. La preuve définitive de cette synonymie nouvelle a été récemment apportée dans la mise au point de RAPPAZ (1984).

BIBLIOGRAPHIE

BUTIN H. — comm. verbale du 10 déc. 1984.

BUTIN H. and AQUILAR A.M., 1984 — Blue-stain fungi on *Nothofagus* from Chile, including two new species of *Ceratocystis* Ellis & Halst. *Phytopathol. Z.* 109 : 80-89.

BUTIN H. und ZIMMERMANN G., 1972 — Zwei neue holzverfärbende *Ceratocystis*-Arten in Buchenholz (*Fagus sylvatica* L.). *Phytopathol. Z.* 74 : 281-287.

CARTER M.V., 1957 — *Eutypa armeniacae* Hansf. et Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in southern Australia. *Austral. J. Bot.* 5 : 21-35.

CARTER M.V., BOLAY A. and RAPPAZ F., 1983 — An annotated host list and bibliography of *Eutypa armeniacae. Rev. Plant Pathol.* 62 : 251-258.

GLAWE D.A. and ROGERS J.D., 1982 — Observations on the anamorphs of six species of *Eutypa* and *Eutypella. Mycotaxon* 14 : 334-346.

HUNT J., 1956 — Taxonomy of the genus *Ceratocystis. Lloydia* 19 : 1-58.

LOOS W., 1932 — Über eine buchenholzbewohnende *Ceratostomella, Ceratostomella fagi* nov. sp. *Arch. Mikrobiol.* 3 : 370-383.

MOREAU C., 1952 — Coexistence des formes *Thielaviopsis* et *Graphium* chez une souche de *Ceratocystis major* (van Beyma) nov. comb. Remarques sur les variations des *Ceratocystis. Rev. Mycol.* 17, *suppl. colon.* (1) : 17-25.

PACLT J., 1954a — Mykoflora zapareného bukového dreva. *Ceskà Mykol.* 18:77-82.

PACLT J., 1954b — O variegácii bukového dreva I. *Biológia (Bratislava)* 9 : 384-390.

PALCT J., 1973 — *Eutypa armeniacae* Hansford et Carter ex Carter, ein blosses Synonym von *Eutypella prunastri* (Pers. ex Fr.) Sacc.? *Mitt. Klosterneuburg* 23 : 205-206.

RAPPAZ F., 1984 — Les espèces sanctionnées du genre *Eutypa* (Diatrypaceae, Ascomycètes). Étude taxonomique et nomenclaturale. *Mycotaxon* 20 : 567-586.

UPADHYAY H.P., 1981 — A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis.* Athens. Univ. Georgia Press.

UPADHYAY H.P. and KENDRICK W.B., 1975 — Prodromus for a revision of *Ceratocystis* (Microascales, Ascomycètes) and its conidial states. *Mycologia* 67 : 798-805.

SCREENING TANNIN-UTILIZING FILAMENTOUS FUNGI FOR PROTEIN PRODUCTION FROM AQUEOUS CAROB EXTRACT

by S. MARAKIS*

SUMMARY. — The carob bean water soluble sugar and tannin extraction procedure by autoclave proved productive and beneficial. For the initial screening 930 isolates of filamentous fungi from various regions of Crete were cultured on aqueous carob extract. Values of growth parameters like : specific growth rate (μ), biomass yield (y), protein yield (yp) and amount of carob tannin utilization were higher in cultures of carob bean and storehouse soil sample isolates than those from carob tree plantation soil samples. The microorganism eventually selected was *Aspergillus carbonarius* (AsDT10) which gave high biomass and protein yield (y = 69.5 % and yp = 25.6 %), specific growth rate ($\mu^{max} = 0.300 h^{-1}$) and tannin utilization (95 % on initial concentration) values. The mycelium was rich in true protein (37.5 %) with balanced amino acid profile but poor in nucleic acids (5.1 %) and ash (4.8 %). The nutritional value of the *A. carbonarius* biomass determined in feeding trials with rats gave : protein efficiency ratio (PER = 1.95 ± 0.1), net protein utilization (NPU = 0.63 ± 0.02), biological value (BV = 0.70 ± 0.01) and true digestibility (TD = 0.85 ± 0.02).

RÉSUMÉ. — L'extraction à l'autoclave des sucres et des tanins solubles contenus dans l'eau des caroubes, s'avère économique et productive. Neuf cent trente champignons filamenteux ont été isolés de différentes régions de la Crète, et ils ont ensuite été cultivés dans un extrait aqueux de caroubes, pour le «screening» initial. Les valeurs de paramètres de croissance des isolements effectués à partir de caroubes et de sol de caroubes stockées, telles que : le taux de croissance spécifique (μ), le rendement en biomasse et en protéine (y, yp respectivement), et le pourcentage des tanins utilisés, sont supérieures à celles des isolements effectués à partir de sol sous les caroubiers. Finalement, on a sélectionné le microorganisme *Aspergillus carbonarius* (AsDT10), qui a donné des rendements en biomasse et protéine considérables (y = 69.5 % et 25.6 % respectivement), un taux de croissance spécifique ($\mu^{max} = 0.300 h^{-1}$), et une utilisation de 95 % des tanins du milieu. Le mycélium de *A. carbonarius* est riche en protéine réelle (37.5 %) avec une teneur équilibrée en acides aminés, mais pauvre en acides nucléiques (5.1 %) et en cendres (4.8 %). L'estimation nutritionnelle de la biomasse de *A. carbonarius* a été déterminée par des essais sur rats; les valeurs des indices de nutrition sont : le coefficient d'efficacité protéique (PER = 1.95 ± 0.1), l'utilisation protéique nette (NPU = 0.63 ± 0.02), la valeur biologique (BV = 0.70 ± 0.01) et le taux réel de digestibilité (TD = 0.85 ± 0.02).

KEY WORDS : Carob, carob bean, tannins, fungal protein.

* University of Athens, Institute of General Botany, Athens 157 01, Greece.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptogamie, Mycol.)*, TOME 6 (1985).

INTRODUCTION

The need for more protein is universally recognised. Many schemes have been proposed for supplementing the world's increasing demand for protein with the microbial protein production. Many microorganisms have been cultured for this purpose on a wide variety of inexpensive substrates mainly of agricultural origin.

An agricultural product of low commercial value in Greece is the carob bean (fruit of *Ceratonia siliqua* L. tree). The carob tree naturally grows on barren soils of the Mediterranean regions as well as in other parts with a similar climate. Greece is the fourth largest carob bean producing country in the world. The ripe carob pod (pericarp), although rich in water soluble sugars (more than 50 %; mainly sucrose 70 %; glucose 10 % and fructose 10 % on the total sugars) has a very low crude protein content (about 6 %) on dry weight (CHARALAMBOUS & PAPACONSTANTINOU, 1966; KALAITZAKIS, 1979). The pericarp also contains high levels of total tannins (up to 6 %) mainly condensed (TAMIR & ALUMOT, 1970; TAMIR & al., 1971) which minimizes the nutritional value of carobs because of protein coagulation and astringent taste on ruminants and pigs (OSLAGE & BECKER, 1958; VOHRA & al., 1966; TAGARI & al., 1965; BORNSTEIN & al., 1965; TAMIR & ALUMOT, 1970). In the past aqueous carob extract have been used for studies related to fungal protein production (SEKERI-PATARYAS & al., 1973; DROULISCOS & al., 1976; MACRIS & KOKKE, 1977, 1978) but no studies concerning carob tannins utilization have been published.

Aim of this investigation is the improvement of this agricultural product by studying the growth of filamentous fungi isolated from natural material. These microorganisms must be able to grow in aqueous carob extract and utilize carob tannins; also, to produce tannin-free fungal biomass rich in protein with a balanced amino acid profile.

This paper describes the screening of filamentous fungi. In addition the isolation of the most effective fungus in a) tannin utilization and protein rich biomass production, b) the kinetics of growth and biomass chemical composition was of the main targests of this investigation. Evaluation of the nutritional quality of the produced biomass was also carried out using rats.

MATERIALS AND METHODS

— Microorganisms :

Three hundred samples of natural material i. e. carob beans, soil collected from carob bean storehouses and underneath carob trees, were used for the isolation of 930 filamentous fungi which have been classified in 35 species (CHARPENTIÉ & MARAKIS, 1980). The samples of the natural material were collected from various areas of Crete.

– Preparation of aqueous carob extract :

The carob beans were smashed in a manufacture mil. A 4-Kg quantity of chopped and deseeded carob pods was mixed with 16 liters of deionized water and autoclaved (P = 1 Atm, T = 121°C, t = 30 min). The slurry was passed through cheesecloth and the spent carob resuspended in 10 liters of deionized water and autoclaved once again. The two filtrates were mixed and a syrup containing 10-11 % total sugar and 0.9-1 % total tannins (both hydrolysed and condensed) was obtained.

– Growth media :

The media A, B, C were used. These media were prepared by mixing the aqueous carob extract and some salts. The carob extract was diluted with salt-water solution to a concentration of total sugars 1, 3, 4, 5, 6, 7 and 9 % w/v, so as the composition (g/l) of the media in sugars and salts becomes :

COMPONENTS			MEDIA		
			A	B*	C
Carob sugars			30	10-90	50
Added salts and urea	Nitrogen sources	$(NH_4)_2SO_4$	5	–	–
		$NaNO_3$	–	2.43-21.86	–
		Urea	–	0.86- 7.72	–
		$NH_4H_2PO_4$	–	3.30-29.60	18
		NaH_2PO_4	1	0.41- 3.70	–
		$MgSO_4.7H_2O$	–	0.16- 1.44	0.80
		NaCl	–	–	0.75

* In media B : concentration of added nitrogen sources was calculated on the base of ratio C:N = 10:1, where C = carob sugar carbon. Concentration of both NaH_2PO_4 and $MgSO_4.7H_2O$ were calculation from the ratio Sugar/Salt = 1/0.041 and 1/0.016 respectively.

The carob extract was sterilized by filtration through membrane filter (0.2 μ pore size Gelman Michigan) while the salt solution by autoclave and then these were mixed. The total tannin concentration of each medium constituted about 1/10 of that of the total sugars. The pH was buffered to 5-5.2.

Medium A was used for the primary mass-screening. The selected isolates were cultured in medium B on purpose to optimize culture conditions (inoculum size, incubation time, initial concentration of total sugars and nitrogen and salt sources). The microorganism eventually selected was finally cultured in medium C.

– Preparation of inoculum :

Peripheral growth zone spores from Czapek-Dox agar cultures were obtained after 5-8 days of incubation at optimum temperature for each micro-

organism. Spores were suspended in quater-strength Ringer's solution for 1 min in a Waring blender.

– Batch cultivation :

During primary screening and experiments for the optimization of the culture conditions microorganisms were grown in 100 ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of medium. These flasks were inoculated with $0{,}5.10^6$ -$0{,}2.10^7$ spores/ml of medium and incubated on reciprocal shaker (120 strokes per min.). Temperature and incubation time were regulated in relation to experiment. Each of the above experiments was run in triplicate (five flasks per run). The results were represented as mean values ± stardard error. Cultivation of the microorganism eventually selected for further study (kinetics of growth and chemical composition) was carried out in a fermentor (Tate and Lyle Co, England) consisting of 7 lit-fermentation vessels equipped with agitation and aeration devices and automatic temperature control. The medium (C) was inoculated with spores ($0{,}2.10^7$ spores/ml of medium). Agitation was effected with two impellers at 500 rpm for the first 15 h after inoculation and 800 rpm thereafter. The culture was aerated with compressed air sterilized by filtration (Microflow Ltd. Cat. No L 32, England). The aeration rate was kept at a level of 0.5 l air per 1 l of medium per min. Foaming during microorganism cultivation was controlled manually by adding antifoaming agent (Silicon-Entschäumer Merck). During cultivation pH was automatically controlled at 4.8-5.0 by the addition of NaOH 1N buffer solution. The temperature was stabilized at 32 ± 0.5°C. Samples (50-100 ml) were aseptically withdrawn from the fermentation vessel at three hour intervals during the first 24-hour period. Six and 12 hour intervals withdrawals were carried out at the next 24-hour (25-48) and 36-hour (49-84) period respectively.

– Harvesting and drying of biomass :

The mycelial mats were harvested by suction filtration through Whatman no. 1 filter paper, washed with equal to the culture volume of distilled water and dried by lyophilization to constant weight.

– Analytical methods :

- Total sugars in carob and culture filtrates were determined as described by DUBOIS & al. (1956) method after tannin removal according to the *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 1970) method.

- Total nitrogen was estimated by the method of VARLEY (1966).

- True protein was determined by the method of LOWRY & al. (1951) as modified by GORSUCH & NORTON (1969).

- Cold trichloracetic acid (TCA) soluble and alcohol insoluble fraction of mycelial nitrogen was determined according to the method of DELANEY & al. (1975).

- Nucleic acids were extracted by the method of DELANEY & al. (1975).

RNA was estimated by the method of GOTTLIEB & VAN ETTEN (1964), and DNA by the diphenylamine method (DISCHE, 1955) using bakers's yeast RNA and calf thymus DNA (both Sigma Chemical Co. Ltd. St. Louis U.S.A.) as standards.

- Purines were determined by the method of TREVELYAN (1975).
- Moisture was estimated by oven drying at 105°C to constant weight.
- Ash was determined by ignition at 550°C in an electric muffle furnace.
- Non-protein nitrogen (NPN) was estimated by the *AOAC* (1970) method.
- Total lipids were extracted by the method of WINTER (1963) while the saponification of lipids and esterification of fatty acids in methyl esters carried out by the methods of STOFFEL & al. (1959) and BAYER (1962). Quantitative and qualitative determination of methyl esters was made by gas-chromatography (KAISER, 1965; KULL & JEREMIAS, 1972). Fatty acid content was expressed as the percentage of the total fatty acids.
- Amino acid analysis of the dry mycelium was carried out on hydrolysed samples using a Technicon automatic analyser. The sample proteins were hydrolysed in N_2 saturated environment with 6N HCl at 105°C for 24 h. The hydrolysate was filtered and the HCl-acid removed by evaporation under reduced presure at 40°C. The residue was taken up in 4 ml 0.01 N HCl (pH = 1.9). The high loss of sulfur-containing amino acids which occurs during acid hydrolysis of proteins was prevented by performic acid treatment before hydrolysis (LEWIS, 1966; SCHRAM & al., 1954). Tryptophan determination was made according to SPIES (1967) method. Fluoro-dinitro benzene available lysine was estimated by the method of CARPENTER (1960) as modified by BOOTH (1971). The essential amino acid index (EAAI) was calculated by the method of OSER (1951).
- For determination of caloric content 1 g freeze-dried biomass was burned in a Parr oxygen bomb calorimeter at 32 atm oxygen pressure, standardized with benzoic acid tablets. (239 Kcal = 1 MJ of metabolizable energy (MALEFAKI-PERELA, 1981)).
- B-group vitamins were determined by BELL (1974) method.
- Water-soluble total tannins were extracted by refluxing 1 g freeze-dried biomass in 500 ml of distilled water for 1 h. The total tannins in mycelium extract, carob extract and culture filtrates were estimated by the Folin-Denis colorimetric method (*AOAC*, 1970), using tannic acid as standard. The flavonols were estimated according to SWAIN & HILLIS (1959) method using catechin as standard.
- Carob cellulose and lignin were determined by the JERMYN & ISHERWOOD (1956), VAN SOEST (1963) and UPDEGRAFF (1969) methods.

— Nutritional evaluation :

Male and female rats of the Hooded strain weighing 45-50 g for protein efficiency ratio (PER) and net protein utilization (NPU) tests and 80 ± 5 g for the N balance study were used. The further procedure followed (rat feeding

and calculation of nutritional indices) was as described by MALEFAKI-PERELA (1981), DROULISCOS & MALEFAKI (1980), EGGUM (1973), MILLER & BENDER (1955), BENDER & MILLER (1953).

The experimental diets used in these trials were : stock protein-free, soya bean oil meal and *Aspergillus carbonarius* (AsDT10) biomass. Stock protein-free composition was (g/kg) : maize starch, 660; sucrose, 200; cellulose, 50; maize oil, 50; mineral salts, 30; vitamin supplement, 10 (DROULISCOS & MALEFAKI, 1980). Soya bean oil meal and *A. carbonarius* biomass diets were prepared by adding soya bean oil meal (189 g) and *A. carbonarius* biomass (196 g) in stock protein-free diet to make up 1 kg diet. The total nitrogen content (by analysis) of the diets was about 14.3 g/kg of diet except of the stock protein-free diet (0.78 g/kg). Egg powder (40 g/kg) was included in the stock protein-free diet for the determination of the metabolic and endogenous N.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction of water-soluble carob sugars and tannins :

The aqueous carob extract which was obtained by the method described in material and methods contained 10-11 % total sugars and 0.9-1 % total tannins. On the base of these data, carob pods contained about 58.5 % and 5.8 % on dry weight water extractable sugars and total tannins respectively. SEKERI-PATARYAS & al. (1973) and DROULISCOS & al. (1976) used different methods for carob sugars extraction. These investigators supplied data about the concentration of sugars in the carob extract. On the base of DROULISCOS & al. (1976) data about 31 % and 0.6 % of total sugars and tannins respectively must have been extracted while the concentration in deseeded carob pods has been reported to be 55 % and 6 % respectively (CHARALAMBOUS & PAPACONSTANTINOU, 1966; TAMIR & ALUMOT, 1970). The extraction procedure used in the present investigation resulted in more than 98 % of the carob pod water soluble sugars and tannins removal. Spent carob contained mainly cellulose and lignin. This residue constituted 25 % of the initial carob pod weight which was extracted.

Selection of microorganism :

The procedure used for the selection of suitable organism was :

a) An initial screening based on the 930 isolates

b) An optimization of culture conditions for the best isolates (strains). These cultivations did not present any problems.

Initial screening : The 930 isolates were cultivated in submerged shaking batch cultures in medium A at the optimum temperature for each isolate for 36 h. The strain *A. niger* (M1) simultaneously was cultivated under the same cultural conditions. This microorganism was used as a reference microorganism

for it has been previously studied in the Institute of General Botany, University of Athens for «yields of fungal protein from carob sugars» (SEKERI-PATARYAS & al., 1973).

The criteria accepted for the selection of the best strains were :

- The mycelium dry weight
- The biomass yield (mycelium conversion efficiency) :

$$y = \frac{\text{(g) mycelium dry weight}}{\text{(g) consummed sugars}} \times 100$$

- The protein yield (protein conversion efficiency) :

$$yp = (y).\text{(percentage mycelium crude protein content)}$$

- Percentage of total tannin reduction of the medium.

Among the isolates only those with mycelium dry weight, total substrate tannin reduction, biomass yield (y) and protein yield (yp) more than 50 % of those determined for *A. niger* (M1) were selected. Finally only 60 strains remained which have been classified to belong in 35 species as determined by CHARPENTIÉ & MARAKIS (1980).

Mycelium dry weight	: 3.7-14 mg/ml of medium
Crude protein (Nx6.25)	: 25 -47.5% (on dry biomass)
Biomass yield (y)	: 31 -60%
Protein yield (yp)	: 10 -22.5%
Percentage of tannin reduction	: 19 -70.2% (on initial concentration of medium)

Table I — Growth parameter mean variation of 60 isolates of filamentous fungi cultured in medium A for 36 h.

Tableau I. — Variation moyenne de paramètres de croissance dans 60 isolements de champignons filamenteux cultivés pendant 36 h, dans le milieu A.

The results presented in Table I reveal that mycelium dry weight (14 mg/ml of medium), biomass yield (y = 60 %) and percentage of crude protein content (47.5 %) were higher than those observed in filamentous fungi cultures on various natural substrates (SEKERI-PATARYAS & al., 1973; SHUKLA & DUTTA, 1967; CRUZ & al., 1967; HANG & al., 1975). In addition : a) In 50 % of the strains the mycelium dry weight ranged between 6-10 mg/ml while in 17 % was higher than 11 mg/ml of medium. b) The percentage of protein content was higher in *Fusarium* strains, but the total mycelial protein (mg/ml of medium) was higher in *Aspergillus* strains due to higher mycelium dry weight production.

c) One third of the strains revealed biomass yield (y) to be 45-50 % which is in agreement with the ones referred microbial cultures on synthetic media (SOLOMONS, 1975) while in 27 % ranged 50-60 %. d) Ten isolates obtained from carob tree-plantation soil failed to grow on carob extract (medium A) although they were successfully grown on synthetic Czapek-Dox type medium. Tannin reduction in medium A was significantly higher in cultures where isolates from decaying carobs and carob bean storehouse soil were used. The same was not true for strains isolated from carob tree-plantation soil. This fact can be the result of microorganism adaptation for carob beans.

Further study of initial screening strains; choice of *Aspergillus carbonarius* (AsDT10) for protein production :

Among the initial screening strains only those with tannin reduction between 42-70%, biomass yield (y = 45 %) and protein yield (yp = 18 %) were further cultured on medium B under the best possible culture conditions. These were : *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Rhizopus* and *Paecilomyces* strains.

The optimization of culture conditions improved the results for the investigated parameters by 28-142 % depending on the nature of the parameter as well as on the microorganism.

The microorganism eventually selected was *Aspergillus carbonarius* (AsDT10). This strain was isolated from decaying carobs and further cultured for the kinetics of growth and the chemical composition of the mycelium grown in medium C.

a. Kinetics growth :

The phase of vigorous growth was exponential (Fig. 1). The maximum value of specific growth rate $\mu^{max} = 0.300\ h^{-1}$ to a doubling time of 2.3 h was obtained in this phase. After 36 h of incubation the mycelium dry weight (24.5 mg/ml of medium) reached 75 % of the maximum which was observed at 72 h after inoculation. Biomass yield (y = 69.5 %), protein yield (yp = 25.6 %), dry weight biomass and specific growth rate observed in *A. carbonarius* cultures were significantly higher than the ones reported by SEKERI-PATARYAS & al. (1973), DROULISCOS & al. (1976) and MACRIS & KOKKE (1977) while y value is in agreement with that reported by MACRIS & KOKKE (1978).

The higher (40-50 %) value of y compared to values reported for synthetic media must be due to the fact that carob extract is a complex natural medium which in addition to sugars (used to calculate y) contains non carbohydrate compounds (e. g. tannins) which were consumed by the microorganism.

The initial concentration of total tannins in medium C (about 1/10 of total sugars) was by no means an inhibiting factor. On the contrary it improved growth of *A. carbonarius* while reduced tannins by 90 % after 60 h of incubation (Fig. 1). In *F. moniliforme* cultures reported by MACRIS & KOKKE (1977) the initial tannic acid concentration (about 18 mg per g carob sugar) had no effect on the mycelial growth and remained constant throughout the

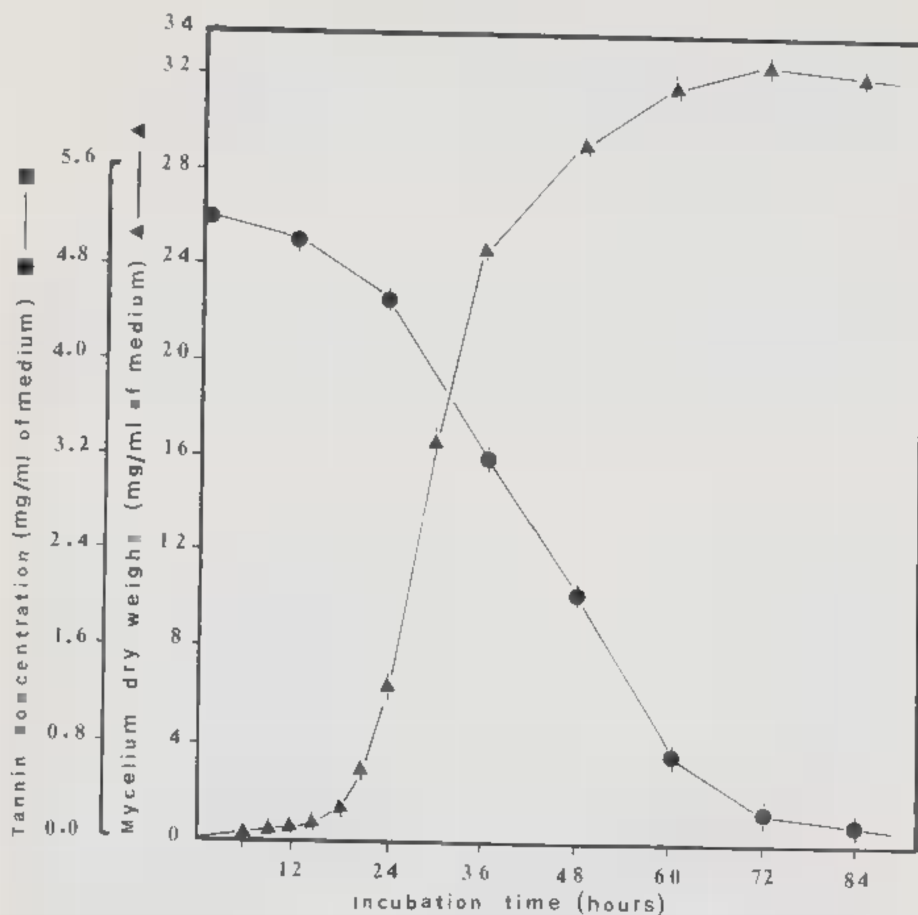


Fig. 1. — Changes in total tannin concentration and mycelium dry weight of *A. carbonarius* cultures in medium C in relation to incubation time.

Fig. 1. — Changements dans la concentration des tanins totaux et le poids sec du mycélium de cultures d'*A. carbonarius* dans le milieu C, en fonction du temps d'incubation.

incubation. According to this *A. carbonarius* proved to be significantly superior than *F. moniliforme* from the point of the utilization of tannins which constitute one of the major factors responsible for the elimination of carob nutritional value.

b. Gross composition of *A. carbonarius* biomass :

Gross composition of the dry mycelium is given in Table II. The true protein N comprises 80 % of the total mycelial N. This amount is at a level comparable to that reported by DROULISCOS & al. (1976) and SMITH & al. (1975). The

Components		%
Total N (TN)	:	7.2
Cold trichloracetic acid (TCA) soluble N	:	1.26
Alcohol insoluble [illegible]	:	5.8
Non-protein N (NPN)	:	1.15
Crude protein (TN x 6.25)	:	45
True protein ((TN)-(NPN)) x 6.25	:	37.8
Lowry protein	:	37.3
DNA	:	0.4
RNA	:	4.7
Total nucleic acids	:	5.1
Total lipid	:	6.7
Ash	:	4.8
Total tannins	:	0.15
Moisture	:	4.9

Table II. – Gross composition (%) of *A. carbonarius* (AsDT10) biomass grown on medium C for 60 h.

Tableau II. – Composition (%) du mycélium sec de *A. carbonarius* cultivé pendant 60 h dans le milieu C.

mycelium true protein content is in agreement with that reported by MACRIS & KOKKE (1977) but significantly higher than the observed by SEKERI-PATARYAS & al. (1973), DROULISCOS & al. (1976). The cold TCA-soluble N fraction which contained mainly free amino acids and peptones constituted 18 % of the total N. The mycelium crude protein and ash content are considered to be acceptable. From the nutritional point of view these factors are important. The ash levels must be low, normally less than 5 %, in a compounded feed. The percentage of the biomass total lipids was about the same as observed in *F. moniliforme* biomass (MACRIS & KOKKE, 1978). The constituent fatty acids of the dry mycelium were : lauric, myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic and linoleic acid. Oleic and linoleic acids were abundant with proportion 60 % and 18 % respectively of the total. Thus mycelium lipids are rich in unsaturated fatty acids. The maximum RNA content of biomass was observed at mid-log phase while the minimum at stationary phase. The minimum RNA level prooved very low compared to published data HEDENSKOG & MOGREN (1973) and TREVELYAN (1975). This is a remarkable feature of this fungus because after 60 h of incubation and while RNA and attached tannin (carob originating) contents were minimum the total amount of mycelial protein (mg/ml) was maximum. Purine content (79.3 μmol/g of dry biomass) was lower than the

maximum observed in *F. moniliforme* mycelium (MACRIS & KOKKE, 1977) as well as that reported by TREVELYAN (1975) for baker's, commercial food yeast and *Rhizopus oryzae*. The percentage of the total mycelium attached tannins was 0.15 % of dry biomass. These tannins positively reacted with vanilin a fact which indicated their flavonol (catechin etc.) contents. Mycelium tannin content, practically non existed if culture time was increased from 60 to 84 hours.

The metabolizable energy of dry mycelium as well as its B-group vitamin content (Table III) satisfy the requirements for the production of microbial protein (SCP). Mycelium riboflavin content was double the one reported by FORAGE (1978). The metabolizable energy (18 MJ/kg of dry mycelium) was 69 % higher than the one reported by FORAGE (1978). This energy is sufficient for the daily requirement of growing rats (MALEFAKI-PERELA, 1981).

B_1	B_2	B_{12}	Biotin	Pantothenic acid	Nicotinic acid	Folic acid	Metabolizable energy
26	85	31	1.8	47	111	37	18

Table III. — B-group vitamin content (μg/g of biomass) and metabolizable energy (MJ/Kg of dry mycelium) of the *A. carbonarius* cultured on medium C for 60 h. (239 Kcal = 1MJ of metabolizable energy).

Tableau III. — Vitamines du groupe B (μg/g de biomasse) et énergie métabolisable (MJ/Kg de mycélium sec) de *A. carbonarius* cultivé dans le milieu C, pendant 60 h (239 Kcal = 1MJ de l'énergie métabolisable).

Amino acid composition of *A. carbonarius* biomass appears in Table IV. The amino acid profile indicated that the sulfur-containing amino acids were deficient compared to the requierments of the growing rat and the United Nations FAO/WHO (1965) reference protein. However compared to methionine and cystine content of other fungi (see Table IV) was higher. An examination of this Table reveals that most amino acids of *A. carbonarius* protein were predominant with the exception of tyrosine, serine and proline. It also becomes clear that valine, arginine, histidine and glutamic acid were significantly higher than those of *F. moniliforme, A. niger* and *A. oryzae*. The value of fluorodinitro benzene reactive lysine was 3.9 g/16gN which represented 74 % of the requirement of the growing rat.

Total essential amino acid content and essential amino acid index for *A. carbonarius* protein were higher than the ones of other fungi (Table IV), yeasts (DELANEY & al., 1975) and certain agricultural by-products vegetable origin (MALEFAKI-PERELA, 1981). Thus it becomes comparable or superior to many other suggested sources of fungal protein.

Amino acid	*A. carbonarius* (AsDT10)	*Aspergillus niger*[a]	*Fusarium moniliforme*[a]	*Aspergillus oryzae*[b]	Requirement of the growing rat[b]
	Grown on carob extract				
Phe	5.7	9.4	3.2	3.8	6.9
Tyr	4.3	5.6	7.3	5.0	
His	3.5	1.9	1.5	1.9	3.5
Ile	6.6	3.4	3.3	3.5	5.3
Leu	5.8	5.6	5.4	5.8	6.4
Lys	6.8	4.7	8.1	4.2	5.3
Met	1.9	1.6	0.9	1.3	4.2
Cys	1.5	0.5	-	1.0	
Thr	4.5	3.8	4.3	3.5	4.3
Val	8.4	4.8	4.2	4.6	5.3
Arg	9.5	5.6	4.9	4.4	1.8
Trp	0.7	0.9	-	1.4	1.0
Total essential amino acids	59.2	47.8	44.7	40.4	
Essential amino acid index	83.2	66.8	60.6	64.9	
Asp	8.5	6.8	7.0	6.9	
Ser	2.5	3.7	3.9	3.6	
Glu	14.5	9.5	10.8	12.4	
Pro	2.4	3.7	3.5	5.2	
Gly	4.1	3.9	4.1	3.7	
Ala	5.1	4.9	6.2	4.6	
Total amino acids	96.3	80.3	80.2	76.8	

a. DROULISCOS [redacted] al. (1976)

b. SMITH & al. (1975)

Table IV. – Amino acid composition (g/16 gN) of *A. carbonarius* biomass grown on medium C. Some other filamentous fungi are shown [redacted] well.

Tableau IV. – Composition en acides aminés (g/16 gN) de biomasse d'*A. carbonarius* cultivé dans le milieu C, ainsi que la composition d'autres champignons filamenteux.

Nutritional quality of *A. carbonarius* (AsDT10) biomass

The nutritional value of the *A. carbonarius* biomass was determined by feeding trials with rats using well established methods. Nutritional indices were : protein efficiency ratio (PER), net protein utilization (NPU), biological value (BV) and true digestibility (TD). Results are given in Table V. PER is comparable to that reported for *F. moniliforme* (DROULISCOS & al., 1976). All indices (except PER) were comparable to those of soya bean oil meal (see Table V) and other protein sources of microbial or agricultural origin (DELANEY &

al., 1975; MALEFAKI-PERELA, 1981). NPU and BV were higher than the ones reported by SMITH & al. (1975) for several filamentous fungi. During the experimental period rats didn't lose their appetite.

Indices	Diets	
	A. carbonarius biomass	Soya bean oil meal
Protein efficiency ratio (PER)	1.95±0.1	2.6±0.15
Net protein utilization (NPU)	0.63±0.02	0.60±0.01
Biological value (BV)	0.70 ± 0.01	0.68 ± 0.02
True digestibility (TD)	0.85 ± 0.02	0.89 ± 0.01

Table V. – Nutritional indices of *A. carbonarius* biomass grown on medium C. The results were represented as mean values ± standard error.

Tableau V. – Indices de nutrition de *A. carbonarius* cultivé dans le milieu C. Les résultats représentent les valeurs moyennes ± erreur standard.

CONCLUSIONS

1. Deseeded carob pod extraction by autoclaving removed 75 % of the carob pod components more of which were sugars and tannins.
2. Microorganisms isolated from carobs and carob storehouse soil indicated high utilization of tannins.
3. *A. carbonarius* (AsDT10) strain appears potentially useful for fungal protein production because :
   - Grows fast and utilizes almost all sugars and total tannins in carob extract medium within 72 h of incubation.
   - Indicates high biomass (y) and protein yield (yp).

- Gross composition of biomass and amino acid profile are comparable or superior to those of the microorganisms which have been suggested for microbial protein production.
- The total mycelium protein and the amount of tannin used were significantly higher than those of other microorganisms studied by other scientists on the carob extract.
- The considerably low mycelium tannin content does not appear to present ▪ toxicological problem or depress protein digestibility.

Finally, from the above, the following general remarks can be summarized :

a) The use of filamentous fungi was generally prefered because the recovery procedure of biomass after fermentation by filtration is more simple and cheap than the recovery of yeasts which has to be carried out by expensive centrifugation. Also, filamentous nature of the fungal biomass makes it suitable for human food.

b) The carob bean water soluble sugar and tannin extraction procedure is worthy even if we consider the extra cost for electricity, since the quantities extracted were much greater than those of other methods. In addition the spent carob (25 % of the carob pod weight) causes less environmental pollution.

c) If further nutritional tests with *A. carbonarius* mycelium, in accordance with the United Nations guidelines (1974), prove its safety, this microorganism could be used for microbial protein production from a low commercial and nutritional value agricultural product on the purpose of animal feeding. Such feeding trials are currently experienced on quail and rainbow trout.

REFERENCES

A.O.A.C. (1970) – *Official methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists.* 11th ed., Washington, Horwitz W. Ed.

BAYER E., 1962 – Gas-chromatographie. 2. Aufl. Springer-Verlag.

BELL G.J., 1974 – Microbiological assay of vitamins of the B-group in foodstuffs. *Laboratoire practice* 23 : 235-242.

BENDER A.E. and MILLER D.S., 1953 – A new brief method of estimating net protein value. *Biochem. J.* 53 : vii.

BOOTH V.H., 1971 – Problems in the determination of FDNB available lysine. *J. Sci. Food Agric.* 22 : 658-664.

BORNSTEIN S., LIPSTEIN B. and ALUMOT E., 1965 – The metabolizable and productive energy of carobs for the growing chick. *Poultry Sci.* 44 : 519-529.

CARPENTER K.J., 1960 – The estimation of available lysine in animal protein foods. *Biochem J.* 77 : 604-610.

CHARALAMBOUS J. and PAPACONSTANTINOU J., 1966 – Current results of the chemical composition of the carob bean. *In* : CHARALAMBOUS J., *The composition and uses of carob bean*, Nicosia-Cyprus : 25-36.

CHARPENTIÉ M.J. et MARAKIS S., 1980 — La mycoflore des caroubes. *Cryptogamie, Mycol.* 1 : 165-174.

CRUZ R.A., MALAISA R.E., CRUZ T.J. and PUSAG C.C., 1967 — Biological treatment of bagasse enhances its value as a soil conditioner or feed. *Sugar News* 43 : 15-22.

DELANEY R.A.M., KENNEDY R. and WALLEY B.D., 1975 — Composition of *Saccharomyces fragilis* biomass grown on lactose permeate. *J. Sci. Food Agric.* 26 : 1177-1186.

DISCHE Z., 1955 — Color reaction of nucleic acid components. *In* : CHARGAFF E. & DAVIDSON J.N., *The nucleic acids*. New York, Academic Press : 295-305.

DROULISCOS N.J., MACRIS B.J. and KOKKE R., 1976 — Growth of *Fusarium moniliforme* on carob extract and nutritional evaluation of its biomass. *Appl. Environm. Microbiol.* 31 : 691-694.

DROULISCOS N.J. and MALEFAKI B., 1980 — Nutritional evaluation of the germ meal and its protein isolate obtained from the carob seed (*Cetatonia siliqua*) in the rat. *Br. J. Nutr.* 43 : 115-123.

DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. and SMITH F., 1956 — Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chem.* 28 : 350-356.

EGGUM B.O., 1973 — Factors influencing protein utilization in rats and pigs. Beretning fra Forsogslaboratoriet Copenhagen, Landhusholdnings-selskabets Forlag. No 406.

FORAGE A.J., 1978 — Recovery of yeast from confectionery effluent. *J. Process Biochem.* Vol. 13 no 1.

GORSUCH T.T. and NORTON R.L., 1969 — The determination of protein in biological materials and foodstuffs. *J. Food Technol.* 4 : 1-6.

GOTTLIEB D. and VAN ETTEN J.L., 1964 — Biochemical changes during the growth of fungi. I. Nitrogen compounds and carbohydrate changes in *Penicillium atrovenetum*. *J. Bacteriol.* 88 : 114-121.

HANG Y.D., SPLITTSTOESSER D.F. and WOODAMS E.E., 1975 — Utilization of brewry spent grain liquor by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol.* 30 : 879-880.

HEDENSKOG G. and MOGREN H., 1973 — Some methods for processing of Single Cell Protein. *Biotechnol. Bioeng.* 15 : 129-142.

JERMYN M.A. and ISHERWOOD F.A., 1956 — Changes in the cell wall of the pear during ripening. *Biochem. J.* 64 : 123-132.

KAISER R., 1966 — Chromatographie in der Gasphase, Teil IV. B.I. Hochschultaschenbücher 92/92a Bibliograph. Institut, Mannheim.

KALAITZAKIS J.A., 1979 — «Étude des sucres pendant la croissance du fruit de la plante *Ceratonia siliqua*». Thèse de Doctorat, Université d'Athènes (en grec).

KULL U. and JEREMIAS K., 1972 — Die Fettsäurezusammensetzung der Lipide aus Rinden von *Populus balsaminifera* in Jahresgang. *Pflanzenphysiol.* 68 : 55-62.

LEWIS O.A.M., 1966 — Short ion-exchange column method for the estimation of cystine and methionine. *Nature (London)* 209 : 1239-1240.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J., 1951 — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.

MACRIS B.J. and KOKKE R., 1977 — Kinetics of growth and chemical composition of *Fusarium moniliforme* cultivated on carob aqueous extract for microbial protein production. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4 : 93-99.

MACRIS B.J. and KOKKE R., 1978 — Continuous fermentation to produce fungal protein. Effect of growth rate on the biomass yield and chemical composition of *Fusarium*

moniliforme. Biotechnol. Bioeng. 20 : 1027-1035.

MALEFAKI-PERELA B., 1981 – «intérêt d'une protéine des sous-produits agricoles d'origine végétale». Thèse de Doctorat, Université de Patra (en grec).

MILLER D.S. and BENDER A.E., 1955 – The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. *Br. J. Nutr.* 9 : 382-388.

OSER B.L., 1951 – Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. *J. Amer. Diet. Assoc.* 27 : 396-402.

OSLAGE H.J. and BECKER M., 1958 – An assay of the nutrient value of carob beans for ruminants, especially the detrimental effect of the tannic acid content upon protein digestibility. *Arch. Tierernaehr.* 8 : 271-277.

SCHRAM E., MOORE S. and BIGWOOD E.J., 1954 – Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.* 57 : 33.

SEKERI-PATARYAS K.E., MITRAKOS K.A. and GEORGHI M.K., 1973 – Yields of fungal protein from carob sugars. *Econ. Bot.* 27 : 311-319.

SHUKLA J.P. and DUTTA S.M., 1967 – Production of fungal protein from waste molasses. *Indian J. Technol.* 5 : 27-28.

SMITH R.H., PALMER R. and READE A.E., 1975 – A chemical and biological assessment of *Aspergillus oryzae* and other filamentous fungi as protein for simple stomached animals. *J. Sci. Food Agric.* 26 : 785-795.

SOLOMONS G.L., 1975 – Submerged culture production of mycelial biomass. *In* : SMITH J.E. & BERRY D.R., *The filamentous fungi*, Vol. 1. *Industrial mycology*. London, E. Arnold : 249-264.

SPIES J.R., 1967 – Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chem.* 39 : 1412-1416.

STOFFEL W., CHU F. and AHRENS E.H., 1959 – Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Analytical Chem.* 31 : 307-308.

SWAIN T. and HILLIS W.E., 1959 – The phenolic constituent of *Prunus domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10 : 63-68.

TAGARI H., HENIS Y., TAMIR M. and VOLCANI R., 1965 – Effect of carob pod extract on cellulolysis, proteolysis, deamination and protein biosynthesis in an artificial rumen. *Appl. Microbiol.* 13 : 437-442.

TAMIR M. and ALUMOT E., 1970 – Carob tannins-growth depression and levels of insoluble nitrogen in the digestive tract of rats. *J. Nutr.* 100 : 573-580.

TAMIR M., NACHTOMI E. and ALUMOT E., 1971 – Degradation of tannins from carob pods (*Ceratonia siliqua*) by thioglycolic acid. *Phytochemistry* 10 : 2769-2774.

TREVELYAN W.E., 1975 – Determination of uric acid precursors in dried yeast and other forms of Single Cell Protein. *J. Sci. Food Agric.* 26 : 1673-1680.

UNITED NATIONS FAO/WHO, 1965 – Protein requirements. *Nutrition Meetings Report no 37*, United Nations, Rome.

UNITED NATIONS, 1974 – *Protein Advisory Group Guidelines No 15 on the nutritional and safety aspects of novel sources of protein for animal feeding*, United Nations, Rome.

UPDEGRAFF D.M., 1969 – Semi-micro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochem.* 32 : 420-424.

VAN SOEST P.J., 1963 – Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.* 46 : 829-835.

VARLEY J.A., 1966 – Automatic methods for the determination of nitrogen, phosphorus and potassium in plant material. *The Analyst* 91 : 119-126.

VOHRA P., KRATZER F.H. and JOSLYN M.A., 1966 – The growth depressing and toxic effects of tannins to chicks. *Poultry Sci.* 45 : 135-142.

WINTER E.Z., 1963 – Über ein neues Verfahren zur Bestimmung und Untersuchung von Fetten in Lebensmitteln. *Lebensmittel-Unters. u. Forsch.* 123 : 205.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ALCOOL DÉSHYDROGÉNASE CHEZ LES PLEUROTES DES OMBELLIFERES. II – ÉTUDE QUANTATIVE[1]

par Prosper BALOUNGA*

RÉSUMÉ. – L'activité alcool déshydrogénase et la croissance mycélienne de deux souches homocaryotiques et d'une souche dicaryotique de Pleurotes des Ombellifères (*Pleurotus eryngii*) sont suivies, premièrement après introduction de différentes concentrations d'éthanol dans le milieu de culture et deux semaines de croissance, deuxièmement en fonction du temps, sur milieu témoin et sur milieu éthanol 2 %. L'activité A.D.H. n'est pas uniforme dans le temps et les pics d'activité maximale se situent toujours avant la fin de la phase de croissance exponentielle. Le dicaryon présente un comportement fondamentalement différent de celui de ses deux homocaryons constitutifs mais ceux-ci expriment leurs propres caractéristiques.

SUMMARY. – Alcohol dehydrogenase activity and mycelial growth are studied on two homokaryotic and [redacted] dikaryotic isolates from *Pleurotus eryngii*. First, different ethanol concentrations [redacted] introduced in the cultural medium and analysis are performed after two weeks. Secondly, mycelia are grown separately on reference and 2 % ethanol cultural media and analysed at different ages. A.D.H. activity is not uniform in time and maxima occur always before the end of exponential growth. The dikaryon exhibits a fundamentally different behaviour than its two constituting homokaryons that exhibit their own characteristics.

MOTS CLÉS : *Pleurotus eryngii*, Basidiomycètes, homocaryons, dicaryons, alcool déshydrogénase.

INTRODUCTION

L'étude qualitative de l'activité alcool déshydrogénase (A.D.H.) chez les Pleurotes des Ombellifères [redacted] mis en évidence deux types de bandes : bandes précoces et bandes de maturité pouvant constituer une base de marqueurs enzy-

1. Ce travail fait partie d'une thèse de 3ème cycle préparée au Laboratoire du G.P.D.P., C.N.R.S. à Gif s/Yvette et au Laboratoire de Cryptogamie, M.N.H.N. à Paris, soutenue le 16 Février 1984 à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.

* Université Marien Ngouabi, B.P. 69, Brazzaville, République populaire du Congo.

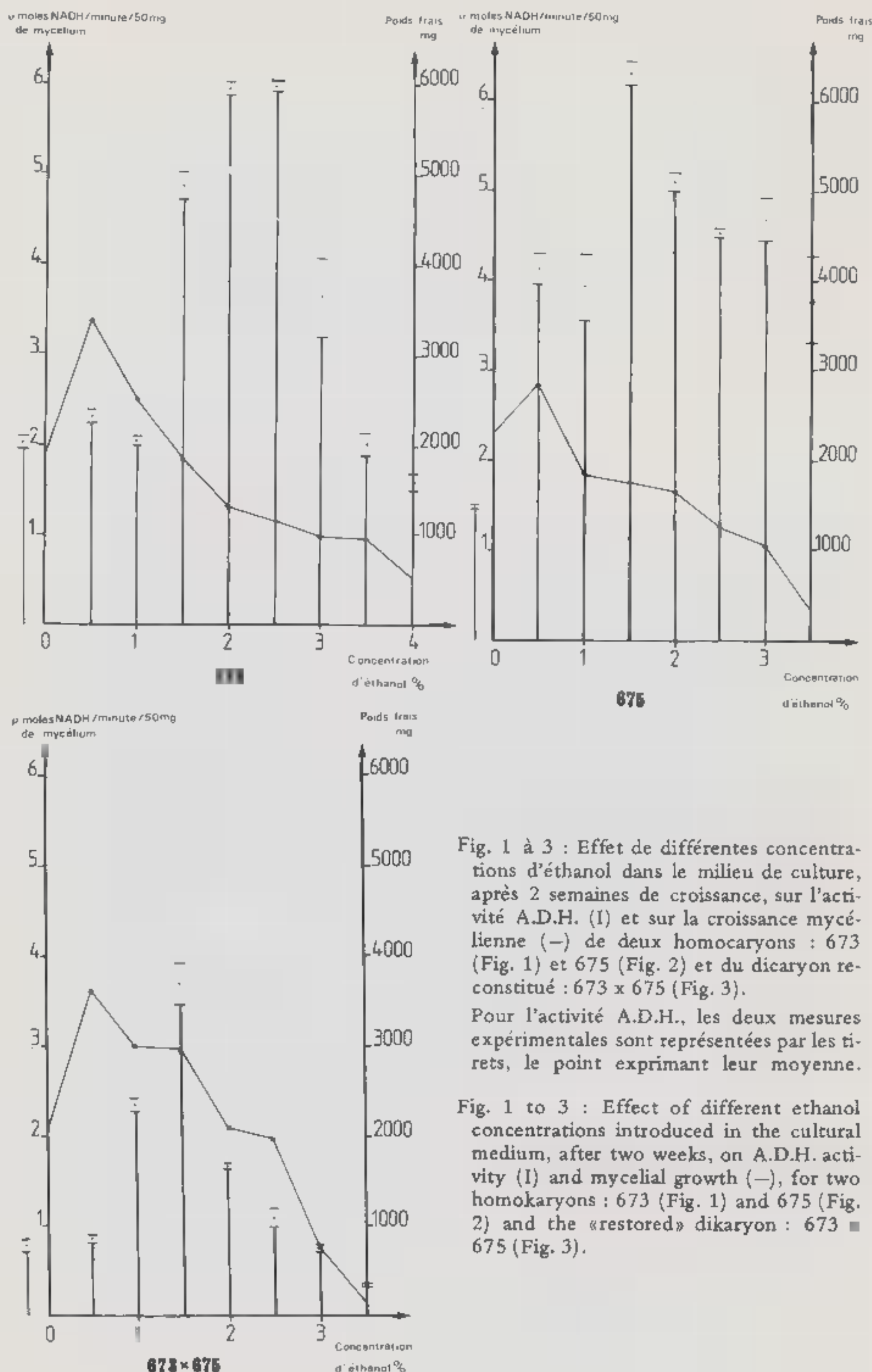


Fig. 1 à 3 : Effet de différentes concentrations d'éthanol dans le milieu de culture, après 2 semaines de croissance, sur l'activité A.D.H. (I) et sur la croissance mycélienne (–) de deux homocaryons : 673 (Fig. 1) et 675 (Fig. 2) et du dicaryon reconstitué : 673 x 675 (Fig. 3).

Pour l'activité A.D.H., les deux mesures expérimentales sont représentées par les tirets, le point exprimant leur moyenne.

Fig. 1 to 3 : Effect of different ethanol concentrations introduced in the cultural medium, after two weeks, on A.D.H. activity (I) and mycelial growth (–), for two homokaryons : 673 (Fig. 1) and 675 (Fig. 2) and the «restored» dikaryon : 673 ■ 675 (Fig. 3).

matiques pour les thalles végétatifs ou agrégés du *Pleurotus eryngii* (BALOUNGA, 1985). Nous étudions à présent l'effet éthanol sur l'activité A.D.H. et sur la croissance mycélienne. Pour cette analyse, différentes concentrations d'éthanol sont introduites dans le milieu de culture du mycélium de Pleurote. Après deux semaines de culture, l'effet éthanol sur l'activité A.D.H. du mycélium est suivie par les cinétiques enzymatiques et sur la croissance mycélienne, cet effet est évalué par le poids frais de mycélium recueilli. Nous avons également comparé l'évolution de l'activité A.D.H. et de la croissance mycélienne sur milieu témoin et sur milieu éthanol. Des essais ont encore été réalisés avec l'acétaldéhyde (BALOUNGA, 1984).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Pour ce travail, nous avons utilisé deux souches homocaryotiques issues d'un dicaryon *P. eryngii* récolté à Montrichard (bords du Cher, France) : l'homocaryon 675 exprime un comportement normal tandis que l'homocaryon 673 présente une croissance réduite. Nous avons également analysé le dicaryon reconstitué résultant de la confrontation 673 x 675.

Méthodes

Le milieu de culture de base pour le mycélium et la technique de préparation des extraits de protéines mycéliennes sont identiques à ceux utilisés dans nos précédents travaux (BALOUNGA, 1985).

L'adjonction d'éthanol au milieu de culture est réalisée dans des conditions stériles, avant l'ensemencement du mycélium.

Pour les cinétiques enzymatiques, l'activité A.D.H. des extraits est évaluée sur la base de la réaction dans le sens N.A.D. vers N.A.D.H., ou éthanol vers acétaldéhyde (RACKER, 1950) et l'augmentation de densité optique à 340 nm, liée à l'apparition du N.A.D.H., est suivie sur un spectrophotomètre (BECKMAN DU-8). Le milieu réactionnel de la cinétique enzymatique est le suivant : tampon pyrophosphate de sodium (0,1M pH 9 contenant 1,67 mg glycine/ml) : 2,5 ml; hydrazine carboxamide (250 mg/ml, pH 6,5) : 0,1 ml; éthanol 96 % : 0,2 ml; nicotinamide adénine dinucléotide (20 mg/ml) : 0,2 ml; glutathione (90 mg/ml) : 0,01 ml; extrait : 0,4 ml. L'activité est exprimée en μmoles de N.A.D.H. apparues par minutes, pour 50 mg de mycélium.

RÉSULTATS

1) Effet éthanol sur l'activité A.D.H. et sur la croissance mycélienne.

Pour étudier l'effet éthanol, nous avons introduit, dans le milieu de culture, des volumes d'éthanol correspondant à des concentrations de 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 % et 4 % et les résultats des analyses après deux semaines

moles NADH/minute/50mg mycélium

Poids frais mg

5 4 3 2 1 0 — 1 2 3 Tps semaines — 1000 2000 3000 4000 5000

673

moles NADH/minute/50mg de mycélium

Poids frais mg

5 4 3 2 1 0 — 1 2 3 Tps semaines — 1000 2000 3000 4000 5000

675

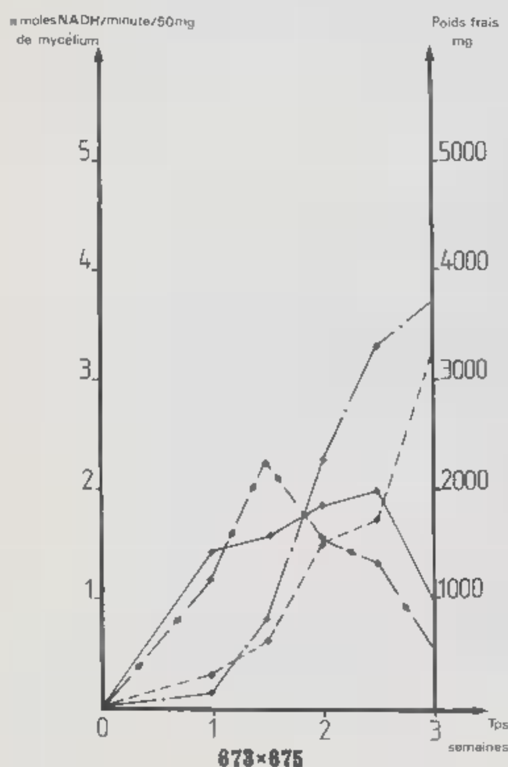


Fig. 4 à 6 : Évolution de l'activité A.D.H. et de la croissance mycélienne en fonction du temps, pour deux homocaryons : 673 (Fig. 4) et 675 (Fig. 5) et pour le dicaryon reconstitué 673 x 675 (Fig. 6).

— sur milieu témoin (—◆—◆— : activité enzymatique; — — — : croissance mycélienne).
— sur milieu éthanol 2 % (— : activité enzymatique; —.—.— : croissance mycélienne).

Fig. 4 to 6 : Evolution of A.D.H. activity and mycelial growth in course of time, for two homokaryons : 673 (Fig. 4) and 675 (Fig. 5) and the «restored» dikaryon 673 x 675 (Fig. 6).

— on reference medium (—◆—◆— : enzymatic activity; — — — : mycelial growth).
— on 2 % ethanol medium (— : enzymatic activity; —.—.— : mycelial growth).

de croissance sont reportés, pour les différentes souches, sur les Figures 1 à 3.

En ce qui concerne la croissance mycélienne, les deux homocaryons réagissent de manière comparable : maximum de croissance pour 0,5 % d'éthanol, puis inhibition progressive à mesure que la concentration d'éthanol croît. La seule différence notable est, à 1 %, une légère stimulation de l'homocaryon 673 alors que 675, apparemment plus sensible, est déjà inhibé. Malgré ces différences de sensibilité, les deux homocaryons sont capables d'utiliser l'éthanol, favorable à leur croissance à de faibles doses, c'est-à-dire inférieures ou égales à 1 %.

Par contre, les deux homocaryons expriment des comportements distincts au niveau de leurs activités A.D.H. :

– L'homocaryon 673 semble réagir relativement peu : aux concentrations stimulantes pour sa croissance, il conserve une intensité d'activité égale à celle qu'il exprime spontanément. Cette activité s'accroît notablement de 1,5 à 2,5 % alors que sa croissance commence à être inhibée. Au delà de 2,5 % d'éthanol, poids frais et activité A.D.H. s'effondrent progressivement.

– L'homocaryon 675, au contraire, réagit par une forte augmentation de son activité à toutes les concentrations étudiées, de 0,5 % où il extériorise une stimulation de croissance, jusqu'à 3,5 % où sa croissance est pourtant inhibée. Cette forte augmentation d'activité A.D.H. observée en présence d'éthanol et peu dépendante de l'inhibition de croissance semble mieux correspondre à une réaction de détoxification que ne le suggère le comportement de l'homocaryon 673.

Le dicaryon 673 x 675 montre une croissance stimulée jusqu'à une concentration de 2 % d'éthanol, extériorisant là une potentialité propre par rapport à ses homocaryons constitutifs, inhibés au delà d'une concentration de 1 % d'éthanol. L'activité A.D.H. n'est pas modifiée à 0,5 % et montre à 1,5 % un maximum beaucoup plus faible que ceux des homocaryons, ce qui n'est pas l'indice d'une intense activité de détoxification. A toutes les autres concentrations d'éthanol, l'activité A.D.H. semble proportionnelle au poids frais, ce qui suggère au contraire l'hypothèse d'une stimulation d'activité essentiellement d'origine trophique.

2) Évolution de l'activité A.D.H. et de la croissance mycélienne en fonction du temps.

Cette étude permet de suivre la croissance mycélienne et l'activité A.D.H. sur milieu témoin (sans éthanol) et sur milieu éthanol 2 %, concentration à laquelle les deux homocaryons sont inhibés alors que le dicaryon montre encore une croissance légèrement stimulée. L'activité A.D.H. et le poids frais de mycélium obtenus ont été mesurés après 1, 1 1/2, 2, 2 1/2 et 3 semaines de culture et les résultats des analyses sont reportés, pour les différentes souches sur les Figures 4 à 6.

Sur le milieu témoin, les deux homocaryons présentent des vitesses de croissance comparables, sur la base des pentes au cours de la phase exponentielle. Cependant, l'homocaryon 673, à croissance limitée, exprime un «vieillissement»

plus rapide, caractérisé par une entrée plus précoce en phase stationnaire (le pic d'activité A.D.H. est d'ailleurs également un peu plus précoce). Le dicaryon 673 x 675 présente une pente de phase exponentielle légèrement plus faible, mais n'est pas affecté par le facteur de «vieillissement» précoce propre à l'homocaryon 673. D'une manière générale, le comportement du dicaryon se rapproche plutôt de celui de 673 pour l'activité A.D.H. et de celui de 675 pour la croissance. Ceci permet de penser que l'évolution de l'activité A.D.H. et la croissance, phénomènes concomitants, puisse être génétiquement dissociables.

Sur milieu éthanol, on constate que :

– la présence d'éthanol constitue un facteur limitant pour la croissance des deux homocaryons, avec réduction de la pente de la phase exponentielle et retard de l'entrée en phase stationnaire pour 673. La croissance du dicaryon est, au contraire, stimulée.

– la présence d'éthanol accroît l'activité A.D.H. chez les deux homocaryons : par prolongation de la durée de la production chez 673, et par augmentation de production sans modification de la durée chez 675. Le dicaryon, quant à lui, ne présente pas de modification majeure, ni au niveau de l'activité maximale enregistrée, ni au niveau de la vitesse de production initiale. Il semble maintenir seulement plus longtemps une intensité d'activité A.D.H. assez proche de celle du pic qu'il extériorise spontanément sur le milieu témoin.

Dans tous les cas, que le mycélium soit homocaryotique ou dicaryotique, et qu'il s'agisse du milieu témoin ou du milieu éthanol, le maximum de l'activité A.D.H. précède la fin de la croissance exponentielle. Cette observation expérimentale permet de suggérer que le déclin de l'activité A.D.H. ne soit pas le résultat de modifications métaboliques consécutives au passage à la phase stationnaire, mais qu'il soit plutôt associé à un âge physiologique du mycélium encore en phase exponentielle. Cette hypothèse coïncide avec les résultats de l'analyse qualitative (BALOUNGA, 1985), mettant en évidence l'apparition de «bandes de maturité» chez le dicaryon, à âge constant.

3) Effet acétaldéhyde sur l'activité A.D.H. et sur la croissance mycélienne.

Toutes les tentatives de culture en présence d'acétaldéhyde s'étant avérées négatives, même aux concentrations de 0,25 % et 0,5 %, l'acétaldéhyde semble constituer un véritable poison pour le mycélium des souches homocaryotiques ou dicaryotiques.

La présence de l'acétaldéhyde dans le milieu de culture étant incompatible avec la survie du champignon, on peut penser qu'il en soit de même d'une accumulation d'acétaldéhyde dans le mycélium. Son élimination s'avère donc obligatoire. Un tel résultat ne nous paraît pas surprenant puisque chez *Drosophila melanogaster*, la concentration léthale de l'acétaldéhyde se situe aux alentours de 0,5 % (DAVID, 1977). D'après DICKINSON (1970), dans l'organisme animal, l'acétaldéhyde doit être éliminée par une réaction couplée qui la transforme en

acétate, non toxique et utilisable comme source énergétique, grâce à l'aldéhyde oxydase.

CONCLUSIONS

Notre travail a permis de mettre en évidence deux caractéristiques des activités A.D.H. au cours du cycle végétatif du *Pleurotus eryngii*, que son thalle soit homocaryotique ou dicaryotique :

– l'expression de l'activité A.D.H. n'est pas uniforme dans le temps, elle croît puis décroît avec l'âge du mycélium, pour disparaître à l'âge de quatre semaines.

– le pic d'activité A.D.H. maximale se situe toujours avant la fin de la phase de croissance exponentielle, y compris chez l'homocaryon 673 dont l'entrée précoce en phase stationnaire est assortie d'un pic précoce d'activité A.D.H.

Une précédente étude (BALOUNGA, 1985) montre que les homocaryons présentent un polymorphisme enzymatique qui s'extériorise, avec les techniques utilisées, par l'expression de trois bandes d'isoenzymes. Toutefois, ce polymorphisme n'est assorti d'aucune variabilité. L'évolution de l'activité A.D.H. au cours de la croissance homocaryotique sur milieu témoin est donc purement quantitative.

La comparaison des comportements de deux homocaryons, l'un à développement «normal» (675), l'autre à développement «réduit» (673) montre que, dans les deux cas, les homocaryons sont capables d'utiliser l'éthanol à de faibles doses (0,5 à 1 %) mais que des concentrations élevées réduisent la vitesse de croissance du premier, agissant alors à la manière d'un facteur limitant, mais masquent les caractéristiques de «développement réduit» du second. On aboutit alors à des courbes de croissance pratiquement identiques.

– l'homocaryon 673, dont l'activité A.D.H. reste stable aux concentrations trophiques (0,5 à 1 %), ne semble guère répondre par une stimulation d'activité A.D.H. aux concentrations inhibitrices de la croissance : les variations décelées semblent plutôt correspondre à l'allongement de la durée de production consécutive à la non-expression du caractère de développement «réduit».

– l'homocaryon 675, au contraire, exprime une stimulation d'activité A.D.H. dès les concentrations trophiques et amplifie cette réaction aux concentrations inhibitrices aussi longtemps qu'elles sont compatibles avec la croissance.

Tout se passe donc comme si le premier n'exprimait en toutes circonstances qu'une activité spontanée alors que le second était capable d'exprimer, en plus, une activité inductible par la présence d'éthanol. En outre, si l'on considère que le comportement exprimé par 675 peut représenter une réaction de détoxification, la comparaison des cinétiques de croissance des deux homocaryons sur milieu témoin et sur milieu à 2 % d'éthanol laisse penser que cette détoxification est un processus peu efficace, puisqu'elle s'accompagne d'une réduction importante de poids frais final alors que pour 673, la non-expression du développe-

ment réduit maintient inchangé ce poids final. En d'autres termes, la détoxification exprimée par 675 représenterait peut-être moins un processus destiné à réduire l'inhibition qu'une simple exacerbation d'une activité inductible en présence d'éthanol. Ce point nécessiterait l'étude, parmi la descendance homocaryotique du dicaryon 673 x 675, d'éventuels recombinants à développement «réduit» et activité «inductible» d'une part, et à développement «normal» sans activité «inductible» d'autre part.

Le dicaryon 673 x 675 exprime, pour sa part, un comportement fondamentalement différent de ceux de ses deux homocaryons constitutifs. Dans nos deux essais, sa croissance est stimulée et non inhibée par la présence d'éthanol. Il utilise activement l'éthanol jusqu'à un peu plus de 2 %, avec augmentation de sa vitesse de croissance et une entrée semble-t-il un peu plus précoce en phase stationnaire. La stimulation modérée de son activité A.D.H. jusqu'à une concentration d'éthanol un peu supérieure à 2 % dans les premiers essais ou l'étalement du pic dans les seconds essais représentent simplement le développement ou le maintien d'une forte activité A.D.H. destiné à métaboliser l'éthanol dans le milieu. Il ne détoxifie donc pas plus que l'homocaryon 673, mais montre une bien meilleure résistance à l'éthanol et l'utilise jusqu'à des concentrations beaucoup plus élevées que ne le font les homocaryons.

Cette différence de comportement du mycélium dicaryotique par rapport aux mycéliums homocaryotiques vient également à l'appui des résultats obtenus par l'étude qualitative menée après électrophorèse et révélation de l'alcool déshydrogénase, par laquelle nous avons pu mettre en évidence l'apparition de «bandes de maturité» chez les dicaryons, non exprimées au niveau des homocaryons.

BIBLIOGRAPHIE

BALOUNGA P., 1984 – Étude de l'activité alcool déshydrogénase chez les Pleurotes des Ombellifères. Thèse 3ème cycle, Paris 6, 82 p.

BALOUNGA P., 1985 – Étude de l'activité alcool déshydrogénase chez les Pleurotes des Ombellifères. I - Étude qualitative. *Cryptogamie, Mycol.* 6 : 153-166.

DAVID J., 1977 – Signification d'un polymorphisme enzymatique : la déshydrogénase alcoolique chez *Drosophila melanogaster*. *Ann. Biol.* 16 : 451-472.

DICKINSON W.J., 1970 – The genetics of aldehyde oxidase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 66 : 487-496.

RACKER E., 1950 – Crystalline ADH from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 184 : 313-319.

TABLE DU TOME 6 – 1985



Commission paritaire : n° 58611
Dépôt légal n° 12675 - Imprimerie de Montligeon
Sortie de presses le 31 décembre 1985

ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE - MYCOLOGIE
Tome 7, 1986

France .... 250 F
Étranger .... 280 F

REVUE DE MYCOLOGIE

Prix des Tomes 1 à 43 :	France : 120 F	Étranger : 130 F
Collections complètes :	réduction de 20 % par tome.	
Prix du fascicule séparé :	France : 35 F	Étranger : 45 F

CRYPTOGAMIE - MYCOLOGIE

Prix des Tomes 1 à 6 :	France : 225 F	Étranger : 250 F
Prix du fascicule séparé :	France : 65 F	Étranger : 75 F

MÉMOIRES HORS-SÉRIE DISPONIBLES

Nº 2 (1942). **Les matières colorantes des champignons**, par I. Pastac. 88 pages : 15 F.
Nº 3 (1943). **Les constituants de la membrane chez les champignons**, par R. Ulrich. 44 pages : 15 F.
Nº 6 (1958). **Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés**, par J. Boidin. 390 pages, pl. et fig. : 120 F.
Nº 7 (1959). **Les champignons et nous** (Chroniques) (II), par G. Becker. 94 pages : 25 F.
Nº 8 (1966). **Catalogue de la Mycothèque** de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. (I) Micromycètes. Macromycètes (première partie). 68 pages : 25 F.
Nº 9 (1967). **Table des Matières** (1936-1965). 85 pages : 20 F. – (1966-1975). 30 pages : 10 F.

FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES
publiée sous la direction de M. Roger HEIM

Tome I. Les Lactario-Russulés, par Roger Heim (1938) *(épuisé)*.
Tome II. Les Rhodophylles, par Henri Romagnesi (1941). 164 pages, 46 fig. : 90 F.
Tome III. Les Mycènes, par Georges Métrod (1949). 144 pages, 88 fig. : 90 F.
Tome IV. Les Discomycètes de Madagascar , par Marcelle Le Gal (1953). 465 pages, 172 fig. : 150 F.
Tome V. Les Urédinées, par Gilbert Bouriquet et J.P. Bassino (1965). 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors-texte : 90 F.

Règlements :
– par virement postal au nom de Cryptogamie- Revue de Mycologie 12, rue Buffon, 75005 Paris, C.C.P. PARIS 6 193 02 K;
– par chèque bancaire établi au même ordre.